

**Neue Methoden der Identitätsprüfung
und Wertbestimmung von
Polysacchariden aus
offizinellen Arzneidroge**

Heide Hermann

1977

Neue Methoden der Identitätsprüfung und Wertbestimmung
von Polysacchariden aus offizinellen Arzneidrogen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt

von

Heide Hermann

aus

Memmingen

März 1977



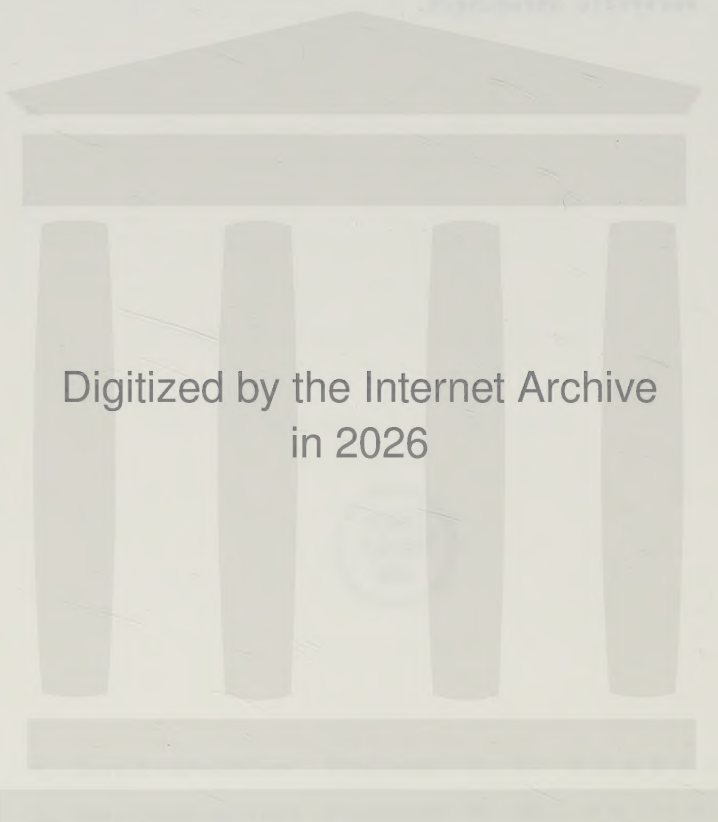
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. Th. S e v e r i n

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juni 1977

Herrn Professor Dr. H. Wagner danke ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und für wertvolle Anregungen.

I. Zusammenfassung	1
1.1. Zielsetzung der Arbeit	1
1.2. Methodik	2
1.3. Ergebnisse	3
1.4. Zusammenfassung	4
II. Einleitung	5
2.1. Zielsetzung der Arbeit	5
2.2. Methodik	6
2.3. Ergebnisse	7
2.4. Zusammenfassung	8
III. Ergebnisse	9
3.1. Zielsetzung der Arbeit	9
3.2. Methodik	10
3.3. Ergebnisse	11
3.4. Zusammenfassung	12
IV. Diskussion	13
4.1. Zielsetzung der Arbeit	13
4.2. Methodik	14
4.3. Ergebnisse	15
4.4. Zusammenfassung	16
V. Zusammenfassung	17
5.1. Zielsetzung der Arbeit	17
5.2. Methodik	18
5.3. Ergebnisse	19
5.4. Zusammenfassung	20
VI. Literaturverzeichnis	21
6.1. Zielsetzung der Arbeit	21
6.2. Methodik	22
6.3. Ergebnisse	23
6.4. Zusammenfassung	24
VII. Anhang	25
7.1. Zielsetzung der Arbeit	25
7.2. Methodik	26
7.3. Ergebnisse	27
7.4. Zusammenfassung	28
VIII. Schlussfolgerungen	29
8.1. Zielsetzung der Arbeit	29
8.2. Methodik	30
8.3. Ergebnisse	31
8.4. Zusammenfassung	32



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0090

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
<u>E I N L E I T U N G</u>	1
<u>A L L G E M E I N E R T E I L</u>	2
1. <u>Schleimdrogen</u>	2
1.1 Bisherige Kenntnisse über Struktur und Zusammen- setzung der Schleime	2
1.2 Pharmakologie	7
2. <u>Untersuchte Drogen der Arzneibücher</u>	9
3. <u>Bisherige Methoden zur Identitätsprüfung und Wert- bestimmung der offizinellen Schleimdrogen</u>	12
3.1 Aschegehalt der Drogen	13
3.2 Quellungszahl der Drogen	15
3.3 Viskosität der Drogenauszüge	19
3.4 Beurteilung bzw. Kritik der bisher von den Arz- neibüchern vorgeschriebenen Wertbestimmungsver- fahren	19
4. <u>Aufgabenstellung</u>	21
5. <u>Isolierung der Schleime</u>	21
6. <u>Neue Methoden zur Identitätsprüfung und Wertbestim- mung der Schleime</u>	24
6.1 Viskosität	24
6.1.1 Viskosität der Schleime vor der Dialyse	24
6.1.2 Viskosität der Schleime nach der Dialyse. . . .	27
6.2 Dünnschicht-Gelchromatographie	29
6.3 Molekulargewichtsbestimmung	34
6.4 Elektrophorese	36
6.4.1 Niedervoltelektrophorese	36
6.4.2 Disk-Elektrophorese	37
6.5 Fraktionierung an DEAE-Cellulose	41

6.6	Aschegehalt	46
6.7	Bildung eines Farbkomplexes mit Alizarin-Natrium-sulfonat	46
6.8	Über den Ca-, Mg-, Na- und K-Gehalt der Schleime	48
6.9	Diskussion der bisherigen Ergebnisse	50
7.	<u>Charakterisierung der Schleime über ihre Hydrolyse-produkte</u>	51
7.1	Versuche zur Strukturermittlung	51
7.2	Hydrolyseverfahren	52
8.	<u>Zucker- und Uronsäurebestimmung</u>	56
8.1	Qualitativer Nachweis der Zucker und Uronsäure	56
8.2	Quantitative Zuckerbestimmung	61
8.2.1	Spektrophotometrie	61
8.2.2	Gaschromatographie	62
8.2.2.1	Zuckeralditolacetate	62
8.2.2.2	Zuckertrimethylsilyläther	67
8.3	Quantitative Uronsäurebestimmung	74
9.	<u>Versuche zur Charakterisierung von Schleimen mit Hilfe spektroskopischer Verfahren</u>	80
9.1	Protonen-Resonanz-Spektroskopie	80
9.2	Massenspektrometrie	83
10.	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse und Vorschlag für einen Analysengang von Schleimen</u>	88
<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>		91
11.	<u>Herkunft der Drogen</u>	91
12.	<u>Allgemeine Arbeitsmethoden</u>	91
12.1	Papierchromatographie für Zucker	91
12.2	Dünnschichtchromatographie	92
12.3	Säulenchromatographie	94
12.4	Gaschromatographie	96

	Seite
12.5 Physikalisch-chemische Untersuchungen	97
13. <u>Durchführung der Untersuchungen</u>	99
13.1 Isolierung von Rohschleim	99
13.2 Ionenaustauscherchromatographie zur Schleimfraktionierung	99
13.3 Disk-Elektrophorese zur Schleimfraktionierung .	100
13.4 Gelchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung der Schleime	101
13.5 Dünnschicht-Gelchromatographie zur Schleimunterscheidung	102
13.6 Hydrolyse der Schleime	104
14. <u>Quantitative Bestimmungen</u>	105
14.1 Zucker und Uronsäure	105
14.1.1 Darstellung der Alditolacetate	105
14.1.2 Darstellung der Trimethylsilyläther	105
14.2 Calcium und Magnesium	106
15. <u>Darstellung von Polysaccharidderivaten</u>	107
15.1 Acetylierung	107
15.2 Benzoylierung	107
15.3 Benzylierung	107
16. <u>Darstellung der Methylzuckeralditolacetate</u>	109
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	111

E I N L E I T U N G

Die Identitätsprüfung und Wertbestimmung von Schleimdrogen und ihre Zubereitungen beschränkten sich bisher auf makroskopische und mikroskopische Untersuchungen und zusätzlich auf die Ermittlung physikalischer Kennzahlen, wie Brechungsindex, Drehvermögen, Quellungszahl und Viskosität der aus den Drogen gewonnenen Schleime.

Diese Bestimmungsmethoden liefern nur grobe Kennzahlen und erlauben keine sichere Identitäts- und Reinheitsprüfung. Außerdem sind sie mit vielen Unsicherheitsfaktoren behaftet. Alle neueren Versuche, diese Methoden zu verbessern, waren wenig erfolgreich, da sich Pflanzenschleime in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften nur sehr wenig unterscheiden. Außerdem ist ihr genauer struktureller Aufbau auch heute noch weitgehend unbekannt.

Durch die Entwicklung neuer chromatographischer und spektroskopischer Verfahren haben sich in der Zwischenzeit die Voraussetzungen für eine Weiterentwicklung der Analytik von Schleimdrogen verbessert.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen sollte es sein, diese Verfahren bei der Ausarbeitung neuer Analysenverfahren für Schleimdrogen zu verwerten.

Für die Untersuchungen wurden die 10 wichtigsten Schleimdrogen ausgewählt, die in den Arzneibüchern DAB 7/BRD, 2.AB/DDR, ÖAB 9 und Ph.Helv.VI aufgeführt sind. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Radix Althaeae, Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Folia Malvae, Flores Malvae, Fructus Ceratoniae, Semen Lini, Semen Psyllii, Semen Cydoniae und Semen Foenugraeci.

ALLGEMEINER TEIL

1. Schleimdrogen

Die "Schleim-Drogen" sind eine Untergruppe der Kohlehydrat- oder Polysaccharid-Drogen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie in Wasser nur quellen oder sich kolloidal lösen, wobei sie unter Volumenvergrößerung beträchtliche Mengen Wasser in sich aufnehmen. Die Schleime (Mucilagines) von Pflanzen niedriger Ordnung sind mit Ausnahme von Lichen islandicus Interzellularschleime (Carrageen, Agar-Agar). Die getrockneten Thalli der Flechte *Cetraria islandica* gehören nach TSCHIRCH (1) zu den Lichenino-Membran-Drogen. Pflanzenteile, meist Samen, Früchte, Wurzeln, Blätter und Blüten von höheren Pflanzen enthalten ihren Schleim in der Sekundärmembran (2). Hierzu gehören etwa 10 im Handel befindliche Drogen, die auch in den Arzneibüchern enthalten sind. Sie sind in Tab.1, S.10, aufgeführt.

Eine weitere Differenzierung in Epidermis- (Semen Lini, Semen Cydoniac, Semen Psyllii) und Endospermschleime (Semen Foenu-graeci) ist möglich. Die Schleimzellen können aber auch wie bei *Radix Althaeae*, *Flores* und *Folia Malvae* über die ganze Pflanze verteilt sein. Für die Pflanze haben sie wahrscheinlich die Funktion eines Reservekohlehydrats, eines Schutzkolloids und - wegen ihres Quellvermögens - eines Wasserreservoirs.

Von der Gruppe der Schleimstoffe trennt man die Gruppe der Gummien ab, die - nur nach Verletzung der Pflanze - als sog. Exsudate ausgeschieden werden und im Gegensatz zu den Schleimen klebrige Eigenschaften besitzen.

Schleimstoffe hingegen bildet eine Pflanze ganz ohne äußere Reize in ihrem normalen Wachstum.

1.1 Bisherige Kenntnisse über Struktur und Zusammensetzung der Schleime

Nach unseren bisherigen Kenntnissen kann man Schleimstoffe folgendermaßen definieren:

Schleimstoffe sind Zuckerpolymere (mit Molekulargewichten zwischen 30.000 und 14 Millionen), die aus gleichen oder verschiedenen Monosacchariden aufgebaut sind.

Am häufigsten kommen folgende Zuckerbausteine vor (3) (Abb. 1):

Aldopentosen: L-Arabinose, D-Xylose

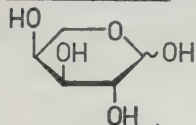
Methylpentosen: L-Rhamnose, L-Fucose

Aldohexosen: D-Glucose, D-Galaktose, D-Mannose, L-Galaktose

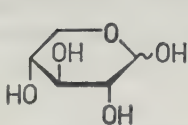
Ketohexose: D-Fructose

Uronsäuren: D-Glucuronsäure, D-Galakturonsäure, D-Mannuronsäure

Aldopentosen

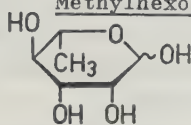


L-Arabinose

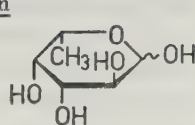


D-Xylose

Methylhexosen

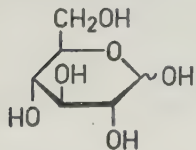


L-Rhamnose

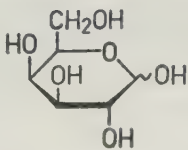


L-Fucose

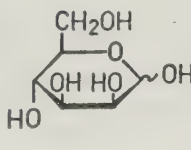
Aldohexosen



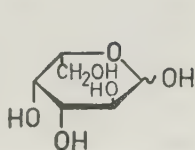
D-Glucose



D-Galaktose

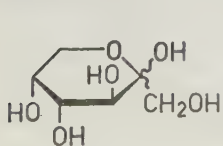


D-Mannose



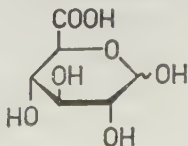
L-Galaktose

Ketohexose

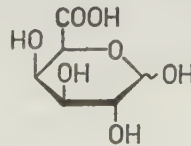


D-Fructose

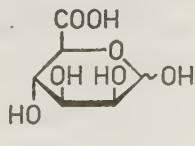
Uronsäuren



D-Glucuron-
säure



D-Galakturon-
säure



D-Mannuron-
säure

Abb. 1

Die genaue Anordnung der Bausteine und damit die Struktur der Pflanzenschleime ist in den wenigsten Fällen bekannt (4-9). Daß man bis heute nur dürftige Kenntnisse besitzt, weist auf ihre komplizierten Zusammensetzungen hin.

Jeder Zucker kann in Furanose- oder Pyranoseform vorliegen, der D- oder L-Reihe angehören, in α - oder β -glykosidischer Bindung verknüpft sein.

Was die Verknüpfung der einzelnen Zucker anlangt, so gibt es die mannigfaltigsten Möglichkeiten. Häufig werden die Kohlenstoffatome 1 und 4 benachbarter Ringe glykosidisch miteinander verbunden, doch kommen auch andere Bindungstypen vor.

Die Uronsäuren können mit Methanol verestert oder als Ca-, Mg- und K-Salze vorliegen. Bei partieller Hydrolyse eines uronsäurehaltigen Makromoleküls gelangt man zu Aldobiuronsäuren (Semen Lini). Die Aufklärung der Aldobiuronsäurestruktur gibt die ersten Anhaltspunkte über die Stellung und Verknüpfung der Uronsäure im Polysaccharidmolekül.

Entsprechend den verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten der Monosaccharide und der weiteren Vernetzung zu Makromolekülen weisen die einzelnen Polysaccharide in ihrem Aufbau entscheidende Unterschiede auf, die sich vor allem in der Strukturfestigkeit, Löslichkeit und im Verhalten gegenüber Enzymen äußern.

Nach neuesten Untersuchungen (10) dürften in den meisten Schleimen Gemische aus mindestens 2 Makromolekülen vorliegen, die linear oder mehr oder weniger verzweigt sind.

Zu den verzweigten Polysacchariden mit langer Hauptkette und vielen kurzen Seitenketten gehören z.B. die Polysaccharide aus *Semen Foenugraeci* und *Fructus Ceratoniae*: an einer Kette aus 1,4- β -glykosidisch verknüpften Mannopyranoseeinheiten sind vereinzelt Galaktopyranoseeinheiten in 1,6- α -glykosidischer Bindung verknüpft.

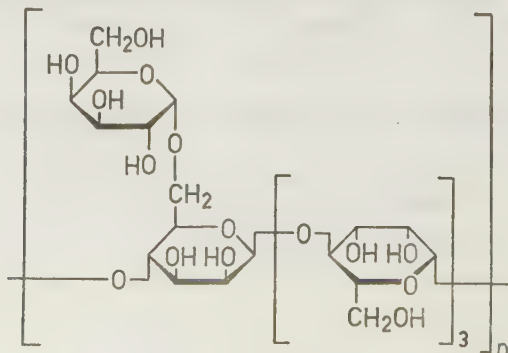


Abb. 2

Oligosaccharideinheit von
Carubin (*Fruct. Ceratoniae*)

Schleimstoffe können in 2 Gruppen eingeteilt werden:

1. in neutrale Schleime, d.h. Polysaccharide, die aus gleichen (Homopolysaccharide, z.B. Lichen islandicus) oder verschiedenen Monosacchariden (Heteropolysaccharide, z.B. Samen *Foenugraeci*) aufgebaut sind und
2. in saure Schleime, d.h. Polysaccharide, die zusätzlich noch Uronsäuren enthalten (z.B. Samen Lini).

Erste chemische Aufklärungsversuche der Pflanzenschleime wurden im Jahre 1919 von FRIEDRICH (11) durchgeführt. Ihre Zusammensetzung und Struktur ist bis heute jedoch nur bruchstückhaft bekannt.

Der chemische Aufbau des Schleimes aus Radix Althaeae konnte bisher nur teilweise aufgeklärt werden. Es kommen in der Droge mindestens 2 neutrale Polysaccharide vor, von denen das eine ein Glukan, das andere ein Galaktan oder ein Arabinogalaktan sein soll. Außerdem liegt ein saures Polysaccharid vor, das aus 2-0- α -D-Galaktopyranuronyl-L-Rhamnopyranose-Einheiten aufgebaut ist (12-15). Bei der Hydrolyse wurden Galaktose, Glucose, Arabinose, Rhamnose und Galakturonsäure nachgewiesen.

Die Polysaccharide von Flores und Folia Malvae setzen sich nach FRANZ (12) aus Glucose, Galaktose, Arabinose, Xylose, Rhamnose und Galakturonsäure zusammen. KARAWYA (14) konnte in Flores Malvae keine Glucose und Rhamnose, in Folia Malvae keine Glucose nachweisen.

Die Molekulargewichte werden für Flores Malvae mit 83 100 und für Folia Malvae mit 62 400 angegeben (12).

Über den Schleim von Folia Plantaginis lanceolatae gibt es in der Literatur keine Angaben.

Der Schleim von Semen Psyllii ist ein Gemisch aus sauren und neutralen Polysacchariden. Bei der Hydrolyse des Plantago indica-Schleimes wurden als Monosaccharidanteile 62% D-Xylose, 6% D-Galaktose, 17% L-Arabinose, L-Rhamnose und D-Galakturonsäure ermittelt. Ebenfalls enthalten ist die Aldobiuronsäure. Sie besteht aus 2-0- α -D-Galaktopyranuronyl-L-Rhamnopyranose (13%) (14,16-18).

Ein Galaktomannan (Carubin) ist der Hauptbestandteil des Endospermischleims von Fructus Ceratoniae. Er setzt sich zusammen aus D-Galaktose und D-Mannose im Verhältnis 1:4 bis 1:7 (19-23). An einer Kette aus 1,4- β -glykosidisch verknüpften Mannopyranose-resten hängen Galaktopyranoseketten in 1,6- α -glykosidischer Bindung (24). Das Molekulargewicht soll 310 000 (25) betragen. Auf Seite 4 ist die Oligosaccharideinheit von Carubin aufgeführt.

Auch der Galaktomannanschleim von Semen Foenugraeci ist aus D-Galaktose und D-Mannose im Verhältnis 5:6 aufgebaut. Unterschiede zwischen beiden Leguminosenschleimen bestehen offenbar nur in der Länge der Mannosekette und der Häufigkeit der Galaktoseseitenketten (26,27).

Bei der milden Hydrolyse des Semen Cydoniae-Schleimes wurden 33% Glucose isoliert, die eine kleinere Menge L-Arabinose und ein Gemisch von Aldobiuronsäuren enthielt. Diese setzen sich aus D-Xylose, die z.T. mit Monomethylhexuronsäure (72%) und nicht-methylierter Hexuronsäure (28%) verbunden ist, zusammen (28,29). Nach MORVAY und STRENDREI (30) liefert das Hydrolysat des Schleimes Galaktose, Glucose, Arabinose, Xylose und Uronsäure.

Der saure Schleim von Semen Lini lieferte L-Galaktose, L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Xylose, L-Fucose und D-Galakturonsäure (31). ERSKINE und JONES (32) trennten mit Hilfe von Kupferacetat und Alkohol den Schleim in eine neutrale (C) und zwei saure (A und B) Fraktionen. Fraktion A (15%) bestand hauptsächlich aus Rhamnose, Xylose und Galakturonsäure und wenig Fucose und Galaktose. Fraktion B (65%) ergab hauptsächlich Galakturonsäure und Galaktose, daneben Rhamnose und Fucose und in Spuren Xylose. Fraktion C (20%) enthielt Xylose (70%), Arabinose (25%), Glucose und Galaktose. Demnach soll eine 8-D-Xylopyranose-Hauptkette vorliegen, die D-Xylopyranose- und L-Arabinofuranose-Seitenketten trägt (33,34,35).

Eine aus dem Partialhydrolysat isolierte Aldobiuronsäure setzte sich wieder aus D-Galakturonsäure und L-Rhamnose (36,37) zusammen (Abb. 3, S. 7).

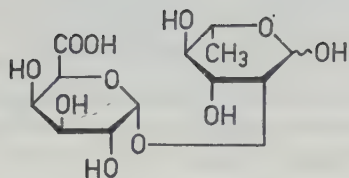


Abb. 3

2-O- α -D-Galaktopyranuronyl-
L-Rhamnopyranose

Der Pflanzenschleim von Folia Farfarae lieferte nach Hydrolyse 23.5% Galaktose, 21.1% Arabinose, 30.1% Fructose, 14.7% Glucose und 10.5% Xylose. Im Rohschleim wurden 5.8% Uronsäure (38) gefunden. HAALAND (39,40) fand ferner Rhamnose, L-Fucose, 2-O-Methyl-D-Xylose sowie ein weiteres Polysaccharid, das nach schonender Hydrolyse ein Glucan und saure Oligosaccharide ergab.

Nach den bisherigen Kenntnissen ist eine strenge, systematische Einteilung der Schleimstoffe nach Pflanzenart, Familie oder Ordnung nicht möglich. Gewisse Übereinstimmung kann man bei der Ordnung der Fabales (Leguminosae) finden, weil die Schleime aus Fructus Ceratoniae und Semen Foenugraeci hauptsächlich ein Galaktomannan enthalten.

Für eine nähere Klassifizierung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

1.2 Pharmakologie

In der Pharmazie und Medizin werden Schleimstoffe wegen ihrer Fähigkeit, mit Wasser zu quellen und viskose kolloidale Lösungen zu bilden, verwendet. Sie entfalten eine nur lokale Wirkung. Diese Wirkung beruht darauf, daß die Schleimhäute von den Mucilagines mit einer Schutzschicht überzogen und dadurch gegen Reize geschützt werden. Gleichzeitig wird damit die Resorption von Wirkstoffen verzögert. Außerdem werden durch die Adsorption an das Kolloid reizend wirkende Substanzen "neutralisiert" (41,42). Schleimdrogen werden innerlich und äußerlich angewandt. Vornehmlich äußerliche Anwendung findet der Quittenschleim bei Rhagaden der Haut als Schutz vor Austrocknung. Samen Foenugraeci und Samen Lini werden äußerlich in Form von Kataplasmen bei Furunkeln, Ulcera cruris und Drüsenschwellungen gebraucht.

Für die innerliche Anwendung von Schleimen ist es wesentlich, daß sie unverändert an den Wirkungsort gelangen und nicht vorher von den Verdauungsfermenten angegriffen werden. Deshalb sollen nach TEUSCHER (43) Drogen wie Radix Althaeae und Semen Foenugraeci nicht bei Magen- und Darmbeschwerden eingesetzt werden, da ihre Schleimstoffe offenbar zu schnell verdaut werden.

Schleimdrogen werden vor allem bei Bronchialkatarrhen verordnet. Die Schutzschicht, die sie bilden, mildert die Reizung der Nervenenden und bewirkt eine Abnahme des Bronchialsekrets (44). Radix Althaeae, Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Flores und Folia Malvae sind in Hustentees und -sirupen häufig verwendete Drogen (45).

Bei Darmkatarrh schützen Mucilagines die Schleimhaut gegen die Reize, die durch den ständig bewegten Darminhalt ausgeübt und durch die Verdauungssäfte und Gärungssäuren verursacht werden. Sie wirken dadurch schmerzstillend und dämpfen die Peristaltik. So wird in der Kinderpraxis Fructus Ceratoniae mit Erfolg zur diätetischen Behandlung von habituellem Erbrechen, Ruhr, Enteritis und Dyspepsie eingesetzt (46,47).

In scheinbarem Gegensatz hierzu wirken Schleimdrogen wie Semen Lini und Semen Psyllii als Laxantien (48), da sie auf osmotischem Wege Wasser aufnehmen und somit zu verstärkter Peristaltik anregen. Bei Verwendung gequetschter Leinsamen wird die laxierende Wirkung durch das in der Droge enthaltene fette Öl noch verstärkt, das als Gleitmittel wirkt. Darüberhinaus kommt dem Leinsamen eine desodorierende, das Wachstum von Fäulniseregern hemmende Eigenschaft zu, die auf der durch die enzymatische Spaltung des Linamarins entstehenden Blausäure beruhen soll (49).

Weiterhin werden Schleime als geschmackskorrigierende Mittel eingesetzt, vor allem bei scharf oder sauer schmeckenden Substanzen. Sie fungieren ferner als einhüllende Mittel für lokal stark reizende Medikamente und bei Vergiftungen mit ätzenden Stoffen wie Alkalien und Säuren.

In der Galenik dienen Schleimstoffe als Emulgatoren, als Binde- und -sprengmittel für Tabletten und zur Herstellung fettfreier Salbengrundlagen (43,50-54).

In der Kosmetik werden Schleimstoffe zur Herstellung von Cremes und Lotionen (55-60), Haarfestigern (61), Wimperntuschen (62) und Parfüms (63,64) verwendet.

In der Nahrungsmittelindustrie spielen die Schleime eine wichtige Rolle zum Klären von Flüssigkeiten (65), als Färbe- (66, 67) und als Verdickungsmittel für Eiscremes (68), Fruchtsäfte (69), Schokoladenmilchmixgetränke (70,71) und Backwaren (72).

Schleimstoffe werden schließlich in der Seidenindustrie, zum Herstellen von Wasserfarben, zum Leimen und Drucken, zur Appretur von Textilien (73) und in der Papierindustrie gebraucht (74,75).

2. Untersuchte Drogen der Arzneibücher

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende 10 Drogen für die Untersuchungen ausgewählt:

Radix Althaeae	Fructus Ceratoniae
Folia Farfarae	Semen Lini
Folia Plantaginis (lanceolatae)	Semen Psyllii
Folia Malvae	Semen Cydoniae
Flores Malvae	Semen Foenugraeci

Sie sind in den nachstehend angeführten deutschsprachigen Arzneibüchern enthalten:

Deutsches Arzneibuch 7.Ausgabe 1968	(DAB 7/BRD)
Arzneibuch der DDR 2.Ausgabe 1975	(2.AB/DDR)
Österreichisches Arzneibuch 9.Ausgabe 1960	(ÖAB 9) und
Pharmacopoea Helvetica editio sexta 1971	(Ph.Helv.VI)

In das Europäische Arzneibuch 1.Ausgabe 1974 (EuAB) wurde keine dieser Drogen aufgenommen. Dagegen sind in der Ph.Helv.VI acht, im ÖAB 9 sieben, im DAB 7/BRD vier und im 2.AB/DDR drei von diesen aufgeführt.

Flores Malvae finden sich im DAB 7/BRD, im ÖAB 9 und in der Ph.Helv.VI. Zu den vier Schleimdrogen des DAB 7/BRD zählen Folia Farfarae. Sie ist auch im ÖAB 9 enthalten.

Folia Plantaginis (lanceolatae), Folia Malvae und Semen Foenugraeci sind offizinelle Drogen des ÖAB 9 und der Ph.Helv.VI. Fructus Ceratoniae ist allein in das 2.AB/DDR aufgenommen, hingegen sind Semen Cydoniae und Semen Psyllii nur im Schweizer Arzneibuch aufgeführt (siehe Tabelle 1).

T a b e l l e 1

Untersuchte Arzneibuchdrogen

Pharmakopöen:	DAB 7/BRD	ÖAB 9	2.AB/DDR	Ph.Helv.VI
<u>Droge:</u>				
Radix Althaeae	+	+	+	+
Folia Farfarae	+	+	-	-
Folia Plantaginis	-	+	-	+
Folia Malvae	-	+	-	+
Flores Malvae	+	+	-	+
Fructus Ceratoniae	-	-	+	-
Semen Lini	+	+	+	+
Semen Psyllii	-	-	-	+
Semen Cydoniae	-	-	-	+
Semen Foenugraeci	-	+	-	+

+ = im Arzneibuch aufgeführte Droge

- = im Arzneibuch nicht aufgeführte Droge

Um Auskünfte über den Grad der Abhängigkeit von Bodenbeschaffenheit, Klima und Lagerung zu erhalten, wurden Drogen verschiedener Herkunft (Folia Malvae aus Holland, Ungarn, Bulgarien, Jugoslawien und Semen Lini aus Marokko und Belgien) vergleichend untersucht.

T a b e l l e 2
Zuordnung der untersuchten Drogen

Drogenbezeichnung (lateinisch)	(deutsch)	Stammpflanze	Familie	Herkunft
<u>Radix</u>	<u>Wurzel</u>			
Althaeae	Eibisch-	Althaea officinalis L.	Malvaceae	Deutschland Ungarn Belgien Frankreich
<u>Folia</u>	<u>Blätter</u>			
Farfarae	Huflattich-	Tussilago farfara L.	Asteraceae	Europa Nordasien Nordafrika
Plantaginis	Spitzwege- rich-	Plantago lanceolata L.	Plantagi- naceae	Europa Nordasien Mittelasien
Malvae	Malven-	Malva silvestris L. und Malva neglecta WALLR.	Malvaceae	Holland Ungarn Bulgarien Jugoslawien
<u>Flores</u>	<u>Blüten</u>			
Malvae	Malven-	Malva silvestris L.	Malvaceae	Balkanländer Belgien Thüringen
<u>Fructus</u>	<u>Früchte</u>			
Ceratoniae	Johannis- brot-	Ceratonia siliqua L.	Caesalpi- niaceae	Spanien Marokko Türkei
<u>Semen</u>	<u>Samen</u>			
Lini	Lein-	Linum usitatissimum L.	Linaceae	Marokko Belgien
Psyllii	Floh-	Plantago psyllium L. und Plantago indica L.	Plantagi- naceae	Südafrika Spanien Italien
Cydoniae	Quitten-	Cydonia oblonga L.	Rosaceae	Persien Spanien
Foenugraeci	Bockshorn-	Trigonella foenum-graecum L.	Fabaceae	Indien Marokko

3. Bisherige Methoden zur Identitätsprüfung und Wertbestimmung der offizinellen Schleimdrogen

Zur Identitätsprüfung der Schleimdrogen schreiben die Arzneibücher makroskopische und mikroskopische Untersuchungen der Ganzdroge und der Drogenpulver vor, auf die hier nicht im einzelnen eingegangen werden soll.

Für Samen Lini ist nach dem 2.AB/DDR eine zusätzliche Identitätsprüfung zum Nachweis der Glykoside Linamarin und Lotaustalin vorgeschrieben. Bei Einwirkung von Wasser auf die zerkleinerten Samen werden diese Stoffe durch das in den Samen enthaltene Ferment Laminarase hydrolytisch gespalten. Die dabei entstandene Blausäure färbt einen Benzidin-Kupferacetat-Papierstreifen graublau.

Für Samen Lini ist im DAB 7/BRD, 2.Nachtrag 1975, der Nachweis der Triglyceride zur Identitätsprüfung aufgeführt. Der Chloroformauszug der gequetschten oder gepulverten Droge wird hierzu dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Auf dem Chromatogramm werden die Triglyceride mit Joddämpfen und Stärkelösung als blaue Zonen sichtbar gemacht. Von diesen sind vier mit einem Vergleichsöl aus Maiskörnern identisch.

Zur Identitätsprüfung der Fructus Ceratoniae wird im 2.AB/DDR Aucubosid nachgewiesen. Hierzu werden die Drogenfragmente mit Salzsäure angefeuchtet, worauf sie sich braun färben sollen. Zu den Reinheitsprüfungen der Monographien gehört der Aschegehalt der Drogen.

Die Wertbestimmung von Radix Althaeae, Folia und Flores Malvae, Samen Lini, Samen Cydoniae, Samen Psyllii und Samen Foenugraeci wird nach den Arzneibüchern DAB 7/BRD, ÖAB 9 und Ph.Helv.VI durch die Ermittlung des Quellungsfaktors durchgeführt. Das 2.AB/DDR fordert für Radix Althaeae und Samen Lini eine Viskositätsbestimmung der wässrigen Drogenauszüge.

Für Folia Farfarae wird im DAB 7/BRD und im ÖAB 9 keine Wertbestimmung vorgeschrieben, da nach dem Kommentar DAB 7/BRD die "Wirkstoff-Frage nicht geklärt ist". Auch für Folia Plan-

taginis ist im ÖAB 9 keine Wertbestimmung angegeben. Allein das Schweizer Arzneibuch läßt den Extraktgehalt dieser Droge ermitteln.

3.1 Aschegehalt der Drogen

Die Aschebestimmung der Drogen dient vorwiegend zur Ermittlung des Gehaltes an nichtflüchtigen anorganischen Bestandteilen. Der Rückstand, auch als "physiologische Asche" bezeichnet, besteht zumeist aus Metalloxiden und Metallsalzen folgender Elemente: Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen sowie Phosphor, Schwefel, Chlor und Silicium. Der Aschegehalt gibt Hinweise über Herkunft, Ernte und Aufarbeitung der Drogen.

In den Monographien der Arzneibücher sind Höchstwerte für den Aschegehalt jeder Droge angegeben, wodurch der Anteil an zulässigen Beimengungen beschränkt wird.

Ein erhöhter Aschegehalt ist entweder auf mangelnde Reinigung oder auf absichtlichen Zusatz von Mineralstoffen, meist Sand, zurückzuführen.

Um den Aschegehalt der Schleimdrogen mit den anderen im Verlauf der Arbeit ermittelten Kennzahlen vergleichen zu können, haben wir diesen bei allen ausgewählten Drogen nach den Vorschriften des DAB 7/BRD bestimmt.

Die Veraschung der Drogen wird in der Weise durchgeführt, daß die Droge in einen Porzellantiegel eingewogen, zunächst vorsichtig verascht und dann auf dunkle Rotglut erhitzt wird bis die Asche kohlefrei und gewichtskonstant ist.

In Tabelle 3, S.14, werden die von uns erhaltenen Werte mit den vorgeschriebenen Höchstwerten verglichen.

T a b e l l e 3

Aschegehalt (Höchstwerte) in % der Schleimdrogen und ihrer Schleime,
bestimmt aus jeweils 1.0 g^{*)}

Droge	Pharmakopöen			Eigene Bestimmungen		
	DAB 7/ BRD	ÖAB 9	2.AB/ DDR	Ph.Helv. VI	a) der Droge	b) des Schleimes
Rad. Althaeae	6.0	6.0	9.0	7.5	6.0	24.7
Folia Farfarae	22.0	22.0	-	-	20.0	74.1
Folia Plantagin- inis	-	12.0	-	14.0	12.0	36.2
Folia Malvae (Jugoslawien)	-	15.0	-	22.0	15.0	40.2
Folia Malvae (Bulgarien)	-	15.0	-	22.0	14.0	36.7
Folia Malvae (Holland)	-	15.0	-	22.0	14.0	38.9
Flores Malvae	14.0	14.0	-	15.0	13.0	16.1
Fructus Cera- toriae	-	-	-	-	3.0	19.7
Semen Lini (Belgien)	5.0	5.0	-	5.0	5.0	6.7
Semen Lini (Marokko)	5.0	5.0	-	5.0	5.0	6.2
Semen Psyllii	-	-	-	6.0	6.0	6.5
Semen Cydoniae	-	-	-	5.0	5.0	10.0
Semen Foenugraeci	-	5.0	-	5.0	5.0	12.1

- = nicht angegeben

*) = Der Aschegehalt wurde als Mittelwert aus 3 Parallelver-
suchen errechnet.

Aus der Tabelle geht hervor, daß sich die einzelnen Drogen in ihrem Aschegehalt erheblich unterscheiden. Der Aschegehalt beträgt bei den Blättern 12 - 20%, bei der Malvenblüte im Mittel 13%, bei der Eibischwurzel ca. 6% und bei den untersuchten Früchten und Samen zwischen 3 - 6%. Aus der Gegenüberstellung mit den vorgeschriebenen Höchstwerten ist zu ersehen, daß die Arzneibücher DAB 7/BRD und ÖAB 9 gleiche, die

Ph.Helv.VI höhere Aschewerte zulassen. Unsere Ergebnisse entsprechen den Anforderungen der Pharmakopöen. Bei den Drogen Farfarae und Flores Malvae lagen sie darunter. Für Fructus Ceratoniae lag kein Vergleichswert vor. Drogenarten aus verschiedenen Anbaugebieten zeigen ziemlich übereinstimmende Werte. Samen Lini-Drogen aus Belgien und Marokko oder Folia Malvae-Drogen aus Ungarn, Jugoslawien, Bulgarien oder Holland besitzen z.B. einen vergleichbaren Aschegehalt. Der Aschegehalt in den Blättern ist bekanntlich deshalb so hoch, weil an den Gefäßenden der Blätter Ionen mit dem Transpirationsstrom passiv austreten und während einer Vegetationsperiode in großer Menge angereichert werden. Nach BORESCH (76), MACH und HERRMANN (77) liegen die Aschewerte für unterirdische Speicherorgane zwischen 3.35 und 5.28%. Wir ermittelten für Radix Althaeae einen Aschegehalt von 6%. Nach den Angaben der genannten Autoren schwankt der Aschegehalt bei Früchten und Samen in wesentlich weiteren Grenzen, nämlich von 1.93 bis 14.52%. Unsere Werte betrugen für Fructus Ceratoniae 3% und für verschiedene Samen-Drogen im Mittel 5 - 6%.

3.2 Quellungszahl der Drogen

Schleimstoffe bilden hydrophile Kolloide, die durch ein hohes Quellvermögen ausgezeichnet sind. Die Quellstoffe bestehen aus fadenförmigen Makromolekülen, die leicht hydratisieren. Bleiben die Makromoleküle durch Nebenvalenzen ($-OH$, $-COOH$, $-C=O$) aneinander haften, so bildet sich ein Hydrogel aus, das als Schleim oder Mucilago bezeichnet wird.

Eine Vernetzung ist auch auf Grund Coulomb'scher Kräfte (Salzbildung) möglich. Beispiel dafür ist die Verknüpfung von Carubin- und Guaran-Kettenmolekülen durch Borsäurebrücken (78).

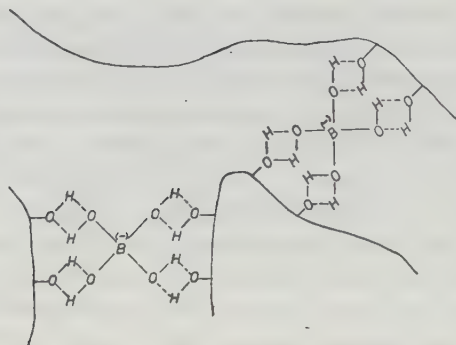


Abb. 4

Verknüpfung von Carubin- und Guaran-Kettenmolekülen durch Borsäurebrücken

Die Ermittlung des Quellvermögens bzw. des Quellungsfaktors der Schleimdrogen wurde erstmals im Ph.Helv.V, 1.Suppl.(1949), zur Wertbestimmung herangezogen. Diese Methode wurde in das ÖAB 9 und später auch in das DAB 7/BRD übernommen. Unter dem Quellungsfaktor, im DAB 7/BRD richtiger als Quellungszahl bezeichnet, versteht man das Volumen in Millilitern, das 1.00 g Droge nach dem Quellen in Wasser (oder in einer anderen gesondert vorgeschriebenen Flüssigkeit) samt anhaftendem Gel nach einer bestimmten Zeit einnimmt.

Die Vorschriften in den Arzneibüchern hierzu sind ähnlich, die geforderten Quellzeiten aber unterschiedlich. So schreibt das DAB 7/BRD 4 Stdn., das ÖAB 9 5 Stdn. und die Ph.Helv.VI 7 Stdn. vor. Wir haben die Quellungszahl nach 4 Stdn. abgelesen. Für die Bestimmung der Quellungszahl verwendet man die Droge gepulvert (Siebnummer 4 und 5, DAB 7/BRD), da die Schleimzellen erst durch die Zerkleinerung freigelegt werden müssen. Befinden sich die Schleimzellen nur in der Epidermis der Droge (Semen Lini und Semen Psyllii), kann die Ganzdroge verwendet werden.

Um ein Zusammenklumpen der Droge und ein Einschließen trockener Teilchen durch bereits gequollene Massen zu verhindern,

ist die Droge jeweils mit Äthanol oder Aceton anzufeuchten. Erst dann wird das Wasser zugegeben. Für Semen Cydoniae muß eine 0,1 M-NaCl-Lösung verwendet werden, da diese Droge sonst kein abgetrenntes Gel gibt (79). Wesentlich ist es, bei konstanter Temperatur (20°C) zu arbeiten, da die Quellung von der Temperatur abhängt.

In der Literatur finden sich keine Angaben über Quellungszahlen von Folia Farfarae, Folia Plantaginis und Fructus Ceratoniae. Wir geben sie hiermit erstmalig an.

Die Tabelle 4, S.18, enthält die Quellungszahlen der eigenen Bestimmungen und die Mindestforderungen der Arzneibücher.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Quellungszahlen der von uns untersuchten Drogen den Mindestforderungen der Pharmakopöen entsprachen. Für die Drogen Semen Lini, Semen Psyllii, Semen Foenugraeci und Semen Cydoniae lagen die ermittelten Werte sogar darüber.

Auswertung:

Zur Bewertung von Schleimdrogen wird die Quellung oder das "Rückhaltevermögen" (80) von Wasser bestimmt. Die Qualität einer Droge ist umso höher zu bewerten, je größer ihre Quellungsfähigkeit ist. Wie aus der Tabelle 4, S.18, ersichtlich ist, besitzt Semen Cydoniae die höchste Quellungszahl, Fructus Ceratoniae die niedrigste. Einen hohen Quellungsfaktor haben Semen Cydoniae, Flores Malvae, Radix Althaeae, Semen Psyllii und Folia Farfarae; einen niedrigen Quellungsfaktor Semen Foenugraeci, Folia Malvae, Folia Plantaginis, Semen Lini und Fructus Ceratoniae.

Daraus geht hervor, daß die Quellungszahlen von Schleimdrogen unabhängig vom Pflanzenorgan sind, d.h. die Samen und Früchte haben nicht generell eine hohe Quellungszahl, wie man hätte erwarten können.

T a b e l l e 4

Ermittelte Quellungszahlen von Schleimdrögen und die der Arzneibücher

Droge	Drogen- menge g	Sieb-Nr. DAB 7/BRD	Anfeuchte- mittel ml	Quell- medium	Eigene Bestimmung	*) DAB 7/BRD	Arzneibuch ÖAB 9 Ph. Helv. VI
Radix Althaeae	1.0	4	1.00 EtOH	H ₂ O	10	10	8
Folia Farfarae	1.0	5	1.00 Me ₂ CO	H ₂ O	9.5	-	-
Folia Plantaginis	1.0	5	1.00 Me ₂ CO	H ₂ O	6	-	-
Folia Malvae	1.0	5	1.00 Me ₂ CO	H ₂ O	7	-	7
Flores Malvae	1.0	5	2.00 EtOH	H ₂ O	14	15	14
Fructus Ceratoniae	1.0	5	1.00 Me ₂ CO	H ₂ O	4	-	-
Semen Lini	1.0	+	1.00 EtOH	H ₂ O	5	4	4
Semen Psyllii	1.0	+	1.00 EtOH	H ₂ O	12	-	10
Semen Foenugraeci	0.5	4	1.00 EtOH	H ₂ O	7	-	6
Semen Cydoniae	0.5	4	1.00 EtOH	0.1 M- NaCl	15	-	12

*) Die Quellungszahlen wurden als Mittelwert aus 3 Parallelversuchen berechnet.

- = nicht angegeben

+ = Ganzdroge

3.3 Viskosität der Droгенаuszüge

Die zweite Möglichkeit der Wertbestimmung der Schleimdrogen ist die Ermittlung der Viskosität der aus diesen gewonnenen wässrigen Droгенаuszüge. Diese Methode findet sich nur im 2.AB/DDR. Hierfür sind sehr genaue Vorschriften angegeben: Eine vorgeschriebene Menge der gepulverten Droge wird in einem Erlenmeyerkolben mit 100.0 ml Wasser versetzt, 60 Minuten lang geschüttelt (Radix Althaeae) oder mit Rückflußkühlung erhitzt (Semen Lini) Nach anschließender Zentrifugation saugt man die überstehende Flüssigkeit durch eine Glasfilternutsche. Mit einem UBBELOHDE-Viskosimeter Größe I wird die Viskosität der Flüssigkeit bei 20°C bestimmt.

Die Durchlaufzeit des zu bestimmenden Volumens der Flüssigkeit wird mit einer Stoppuhr, die die Ablesung von 0.1 Sekunden gestattet, gemessen. Aus dem Mittelwert von mindestens 5 Messungen berechnet man die kinematische Viskosität (ausgedrückt in Zentistokes = cSt) wie folgt:

$$v = k \cdot t$$

v = kinematische Viskosität

k = Gerätekonstante

t = Durchlaufzeit in Sekunden

Diese Methode wird in Kapitel 6.1, S.24, verwendet.

3.4 Beurteilung bzw. Kritik der bisher von den Arzneibüchern vorgeschriebenen Wertbestimmungsverfahren

- (1) Mit der Bestimmung der Quellungszahl einer Droge wird indirekt ihr ungefährender Schleimgehalt ermittelt, der ihrer Verwendung als Mucilaginosum entspricht.

Nach dem Kommentar zum DAB 7/BRD sollen durch die Bestimmung der Quellungszahl Drogen ausgeschaltet werden, "die durch unsachgemäße Ernte, schlechte Lagerung, zu hohes Alter oder durch bewußte Verfälschungen minderwertig oder verdorben sind".

Diese Methode kann jedoch nur zu oberflächlicher Beurteilung der Drogen dienen, denn sie ist approximativ. FLÜCK und AELLIG (81) prüften die verschiedenen Einflüsse auf Quellung und Viskosität der Schleime. Sie fanden, daß Quellung und Viskosität von Temperatur- und pH-Wert-Änderung, sowie von der Anwesenheit bestimmter Ionen abhängig sind.

- (2) Bei Vorliegen von Drogengemischen kann diese Methode nicht gleichzeitig zur Identitäts- und Reinheitsprüfung herangezogen werden. Hier haben die mikroskopischen Verfahren Vorrang.
- (3) Die Bestimmung der Viskosität eines Drogenauszuges ist ebenfalls eine Konventionsmethode, die von vielen Unsicherheitsfaktoren abhängig ist. Untersuchungen über das Viskositätsverhalten von Schleimen aus Fructus Ceratoniae, Semen Cydoniae, Semen Psyllii und Semen Lini sind von ROL, MCCREDIE und WHISTLER (82) beschrieben worden. Zur Messung der Viskosität der Schleime ist anzufügen, daß die Gelstruktur der Schleime beim Durchfluß durch die Kapillare des Viskosimeters, nicht konstant bleibt. Das Ergebnis der Viskositätsbestimmung ist also neben der Molekülgröße und der Molekülgestalt (Kugel- oder Fadenform) des zu analysierenden Schleimes zusätzlich vom Durchmesser der Kapillare abhängig. Neben der Viskositätsmessung gibt es bisher nur für einige Schleime, z.B. Fructus Ceratoniae, Semen Psyllii, Semen Lini und Semen Cydoniae Farb- und Fällungsreaktionen (83), die zur Unterscheidung dienen sollen. Sie sind aber umständlich und unzureichend.
- (4) Bei Vorliegen von extrahiertem, festen "Schleim" ist eine Herkunftsbestimmung auf diesem Wege nicht möglich (Identitätsprüfung).
- (5) Verfälschungen durch andere viskose Beimengungen können nicht erkannt werden (Reinheitsprüfung).
- (6) Für die Qualitätsbeurteilung reichen die bisherigen Verfahren nicht aus.
- (7) Die eigentlichen Gehalte werden nicht direkt bestimmt

4. Aufgabenstellung

Aus 3.4 ergibt sich zwangsläufig die Notwendigkeit, nach neuen Methoden zu suchen, mit denen sich Schleime besser charakterisieren und identifizieren lassen. Dies sollte erreichbar sein durch die Ermittlung zusätzlicher Kennzahlen und Kriterien unter Einbeziehung moderner analytischer Verfahren. Im einzelnen sollte versucht werden, eine weitere Charakterisierung zu erreichen durch:

- (1) Neue Methoden zur Identitätsprüfung der genuinen Schleime,
- (2) Verbesserung der Polysaccharid-Bausteinanalyse durch Wahl einer Hydrolysemethode, die für alle Schleimstoffe geeignet ist, und quantitative Erfassung aller Monosaccharide durch Anwendung moderner Trenntechniken, wie Dünnschicht- und Gaschromatographie,
- (3) vergleichende Analyse von Drogen aus verschiedenen Anbaugebieten,
- (4) Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe von Ultrazentrifugation, Elektrophorese und Gelchromatographie,
- (5) Strukturaufklärung bzw. Verknüpfung der Polysaccharide mittels NMR- und Massenspektroskopie.

Die genaue Strukturaufklärung des einen oder anderen Schleimes konnte nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

5. Isolierung der Schleime

Alle Untersuchungen sollten an den isolierten Schleimen durchgeführt werden.

Die Isolierung aller Schleime wurde nach der von FRANZ (12) vorgeschlagenen Methode durchgeführt. Aus den zerkleinerten Drogen wurden die Schleime mit Wasser bei Raumtemperatur extrahiert, durch Zugabe von Alkohol ausgefällt und anschließend getrocknet.

Die Rohschleimausbeuten aus unseren Drogen sind in Tabelle 5, S.23, zusammengestellt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die bis zur Gewichtskonstanz bei 110°C getrockneten Drogen. Parallel dazu wurden die Quellungsfaktoren bestimmt. Die Quellungsfaktoren der Drogen entsprachen den Mindestforderungen

der Arzneibücher. Die Rohschleimgehalte einiger Drogen wichen dagegen von den Angaben der Literatur ab. So erzielten wir zum Beispiel bei Radix Althaeae eine extrem niedrige Ausbeute. Dies kann seine Ursache in der Erntezeit haben (12). So soll der Schleimgehalt im Spätherbst doppelt so hoch wie im Sommer sein. Bei unserer Droge dürfte es sich demnach um eine im Sommer geerntete Droge gehandelt haben.

Bei Folia Farfarae und Folia Malvae erhielten wir höhere Ausbeuten, als in der Literatur angegeben.

Nach den Vorschriften der Monographien (12,38) sollen diese Drogen auf ca. 1 mm zerkleinert werden. Wir wählten einen Zerkleinerungsgrad von ca. 0.3 mm (Sieb-Nr.5), da wir auch den Quellungsfaktor bestimmten (s.S. 15). Bei der Bestimmung der Membranschleime ist der Zerkleinerungsgrad entscheidend. Je kleiner die Drogenteilchen sind, umso mehr schleimhaltige Zellen können extrahiert werden. Möglicherweise war dies der Grund für die höheren Ausbeuten.

Für Folia Plantaginis lagen keine Vergleichswerte vor. Der von uns ermittelte niedrige Fructus Ceratoniae-Schleimgehalt kann auch durch die abweichende Isolierungsmethode oder durch Herkunft der Droge bedingt sein. Der Schleimgehalt aus Semen Lini entsprach den Mindestforderungen des DAB 7/BRD.

Für den Semen Psyllii-Schleim wird von STEINEGGER u. HÄNSEL (86) ein weiterer Bereich angegeben (4 - 10%). Die Qualität der Droge ist offenbar sehr von der Blüte- und Erntezeit abhängig(87). Auch Frost und Regen beeinflussen die Güte der Droge. Verglichen mit den Angaben der Monographien waren unsere Rohschleimausbeuten sehr niedrig.

Semen Cydoniae wird in 3 Qualitäten gehandelt. Von den Sorten klein, gemischt und groß ist letztere qualitativ die beste. Außerdem hängt die Qualität vom Reinheitsgrad und der Farbe der wässrigen Lösung ab. Unsere Ausbeute war niedriger, als sich in der Literatur finden ließ. Die in den Monographien (89) angegebenen Mindestforderungen mit hohen Ausbeuten sind auf die heiße Extraktion der Droge zurückzuführen.

Üblicherweise werden die Samen von Semen Foenugraeci zerkleinert, da der Schleim im Endosperm lokalisiert ist. Wir verwendeten aber die Ganzdroge, da die zerkleinerten Samen viele Schwebstoffe (z.B. Proteine und fettes Öl) enthalten, die sich selbst durch Zentrifugieren schlecht entfernen ließen.

T a b e l l e 5

Rohschleimgehalt (%) aus jeweils 100.0 g Droge

Droge	Ausbeute in % (mindestens)	
	eigene Isolierung	Autoren
Radix Althaeae	3.90 - 5.40	11.2 FRANZ (12)
Folia Farfarae	12.00 - 16.30	8.2 FRANZ (38)
Folia Plantaginis	7.40 - 9.95	wenig STEINEGGER u.HÄNSEL(84)
Folia Malvae	9.34 - 11.71	8.2 FRANZ (12)
Flores Malvae	4.52 - 5.23	6.8 FRANZ (12)
Fructus Ceratoniae	1.13 - 1.40	2-3 STEINEGGER u.HÄNSEL(85)
Semen Lini	3.30 - 5.36	3-6 (DAB 7/BRD)
Semen Psyllii	3.69 - 4.20	4-10 STEINEGGER u.HÄNSEL(86)
Semen Cydoniae	7.98 - 10.20	22.0 McCREDIE u.WHISTLER(88)
Semen Foenugraeci	10.44 - 12.30	20-30 STEINEGGER u.HÄNSEL(90)

Da die Schleimstoffe in der Pflanze die Funktion eines Wasserreservoirs erfüllen, wird erklärlich, daß vor allem die Blatt-drogen (Transpiration!) durch einen hohen Schleimgehalt ausgezeichnet sind.

Von den Samen-Drogen enthalten Samen Lini und Samen Psyllii weniger Schleim als Samen Foenugraeci und Samen Cydoniae. Das dürfte damit zusammenhängen, daß Linum und Psyllium in gemäßigteren Gebieten, wie Italien, Spanien, Marokko oder Frankreich kultiviert werden, während Cydonia und Foenugraecum in Gebieten mit extrem trockenen Bedingungen, wie Transkaukasien, Arabien und Indien, angebaut werden (Tab. 2, S.11).

6. Neue Methoden zur Identitätsprüfung und Wertbestimmung der Schleime

6.1 Viskosität

6.1.1 Viskosität der Schleime vor der Dialyse

Zum Vergleich mit den Literaturangaben haben wir mit den uns zur Verfügung stehenden Drogen Viskositätsbestimmungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Anlehnung an die Viskositätsbestimmung des 2.AB/DDR der Drogen Radix Althaeae und Semen Lini.

Zur Herstellung der Meßlösungen wurden die Schleime mit 2,5 ml Äthanol angerieben, mit Wasser auf 100,00 ml ergänzt und 1 Stunde im siedenden Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 20°C wurde die viskose Lösung durch einen Glasfiltertiegel 17 G 2 filtriert. Die Viskosität wurde nach 24stündigem Stehenlassen mit einem UBBELOHDE-Kapillarviskosimeter Gr.I gemessen, nach der auf S.19 angegebenen Formel berechnet und in Zentistokes (cSt) angegeben. Der Durchmesser der Kapillare des Viskosimeters soll nach Kommentar DAB 7/BRD, Ziffer 31, so gewählt werden, daß die gemessenen Auslaufzeiten zwischen 100 und 500 Sekunden liegen.

Um eine geeignete Konzentration für alle Schleimstoffe zu finden, ermittelten wir die Viskosität bei verschiedenen Konzentrationen. Mit steigender Konzentration stieg die Viskosität aller Schleimlösungen an, allerdings nicht in linearer Folge. So konnten wir feststellen, daß sich die Viskosität mit steigender Schleimkonzentration (0,1-0,5%) bei Folia Plantaginis, Folia Farfarae, Folia Malvae und Fructus Ceratoniae kaum änderte, während sie bei den Samen- und Radix-Schleimen stark anstieg. Eine einheitliche Konzentration von 0,15% für alle Schleime konnte nicht eingehalten werden, da dies bei Semen Cydoniae eine Auslaufzeit von über 650 Sekunden ergeben und damit nicht mehr den oben genannten Bedingungen des DAB 7/BRD entsprochen hätte. In Tabelle 6, S.25, sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Aus unseren Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß ein hoher Quellungsfaktor der Droge nicht unbedingt einer hohen Viskosität seines Schleimes entspricht. Das zeigt vor allem das Beispiel Flores Malvae.

T a b e l l e 6

Viskosität der Schleime(in cSt) bei verschiedenen Konzentrationen

Schleimkonzentration	0.066%	0.1%	0.15%	0.5%
<u>Schleim aus Droge</u>				
● Radix Althaeae	1.53	2.45	2.56	--
◻ Folia Farfarae	1.09	1.17	1.22	1.30
◻ Folia Plantaginis	1.11	1.21	1.22	1.22
◻ Folia Malvae	1.13	1.20	1.22	1.36
◐ Flores Malvae	1.17	1.52	1.54	--
◻ Fructus Ceratoniae	1.11	1.20	1.22	1.22
○ Semen Lini	2.11	2.45	3.55	--
△ Semen Psyllii	1.69	2.29	3.80	--
× Semen Cydoniae	3.80	4.15	6.72	--
▽ Semen Foenugraeci	1.23	1.51	1.73	--

-- wurde nicht bestimmt, da für diese Betrachtung nicht relevant.

Die Untersuchungen zeigen, daß einige Schleime, wie Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Folia Malvae und Fructus Ceratoniae, ebenso Semen Foenugraeci und Flores Malvae, sehr ähnliche Viskosität besitzen. Unterschiedliche Viskosität weisen bei einer Konzentration von 0.1% nur Radix Althaeae, Semen Lini, Semen Cydoniae und Semen Psyllii auf.

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den von LUCKNER (91) für Drogenauszüge ermittelten Werten, so ergibt sich, daß die Viskosität der von ihm untersuchten Drogenauszüge aus Radix Althaeae und Semen Lini mit der Viskosität unserer 0.1%igen Schleimlösungen übereinstimmt.

Keine Übereinstimmung zwischen Drogenauszug und Schleimlösung fanden wir bei Flores Malvae, Folia Malvae und Semen Foenugraeci. Das kann an LUCKNER's verschiedenen Drogeneinwaagen liegen, die bei Flores Malvae 1.500 g, Folia Malvae 10.000 g und Semen Foenugraeci 2.000 g betrugen.

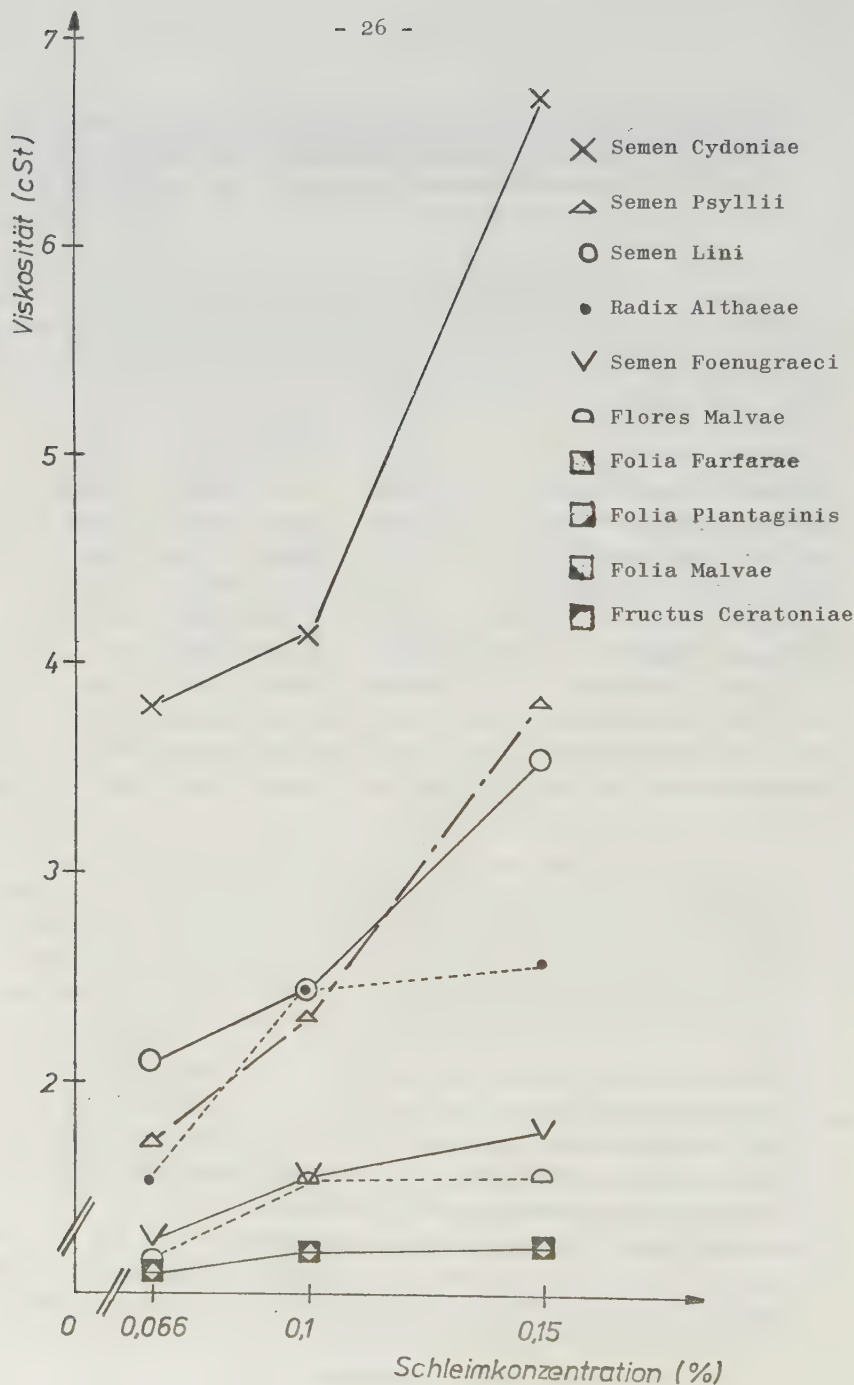


Abb. 5

Viskosität der Schleime (in cSt) bei verschiedenen Schleimkonzentrationen

Die Ergebnisse der Arbeiten von ROL, McCREDIE und WHISTLER (82), die sich mit der Viskositätsbestimmung der Schleime aus Fructus Ceratoniae, Semen Lini, Semen Cydoniae und Semen Psyllii beschäftigten, stimmen dagegen mit den unsrigen überein.

Die graphische Darstellung Abb. 5, S.26, zeigt besonders anschaulich den Viskositätsverlauf bei steigender Schleimkonzentration. Für Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Folia Malvae ergibt sich eine langsam ansteigende Gerade. Man beachte demgegenüber den steileren Verlauf bei den Schleimen aus Semen Lini, Radix Althaeae und Semen Foenugraeci und vor allem bei solchen aus Semen Cydoniae und Psyllii.

6.1.2 Viskosität der Schleime nach der Dialyse

Da die Rohschleime reich an anorganischen Salzen (s.S. 48) sind und diese möglicherweise die Viskosität der Schleime beeinflussen, haben wir die Viskosität der Schleimstoffe auch nach 4-tägiger Dialyse gemessen. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Sie sind in Tab.7, S.29, und graphisch in Abb. 6, S.28, wiedergegeben.

Wir stellten fest, daß die Viskosität der Schleimstoffe nach der Dialyse allgemein zunimmt. Auffallend ist, daß die Folia-, Flores- und Fructus-Schleime mit hohem Ca-Gehalt (s.S. 48) und niedriger Viskosität auch nach der Dialyse ihre Viskosität kaum ändern.

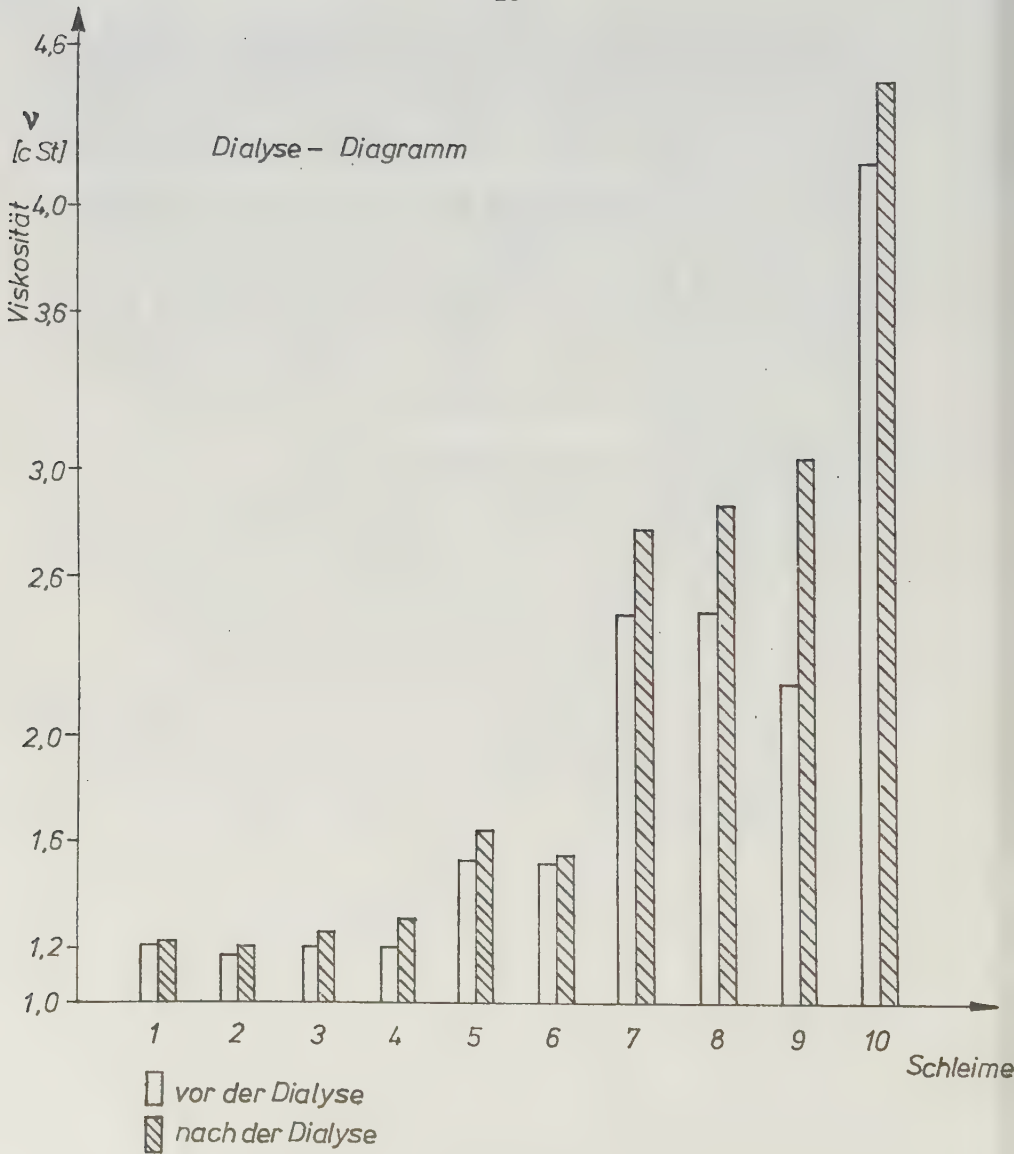


Abb. 6

Dialyse-Diagramm der Schleime

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1 = Folia Plantaginis | 6 = Semen Foenugraeci |
| 2 = Folia Farfarae | 7 = Semen Lini |
| 3 = Folia Malvae | 8 = Radix Althaeae |
| 4 = Fructus Ceratoniae | 9 = Semen Psyllii |
| 5 = Flores Malvae | 10 = Semen Cydoniac |

T a b e l l e 7
Viskosität (cSt) aus jeweils 0.100 g Schleim

Schleim aus der Droge	vor der Dialyse		nach der Dialyse	
		Calcium(%)		Calcium(%)
Radix Althaeae	2.45	4.78	2.87	--
Folia Farfarae	1.17	11.75	1.21	--
Folia Plantaginis	1.21	10.27	1.23	3.75
Folia Malvae	1.20	8.61	1.26	--
Flores Malvae	1.52	5.56	1.64	--
Fructus Ceratoniae	1.20	6.33	1.31	--
Semen Lini	2.45	1.50	2.77	1.25
Semen Psyllii	2.29	0.71	3.04	--
Semen Cydoniae	4.15	0.81	4.45	--
Semen Foenugraeci	1.51	0.37	1.55	--

-- wurde nicht bestimmt, da für diese Betrachtung nicht relevant.

Schleime mit hoher Viskosität hatten nach dem Dialysieren eine große Viskositätsänderung erfahren. Beim Schleim aus Semen Psyllii war die Viskosität um ein Drittel, bei Radix Althaeae um ein Fünftel gestiegen.

6.2 Dünnschicht-Gelchromatographie

Während die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel, Aluminiumoxid, Kieselgur, Cellulose etc. bei niedermolekularen Verbindungen heute allgemein zur Identität und Reinheitsprüfung bzw. zur Qualitätskontrolle mit Erfolg herangezogen wird, bereitet die DC von hochmolekularen Verbindungen auf herkömmlichem Trägermaterial bisher unüberwindliche Schwierigkeiten.

Erste Erfolge in dieser Richtung wurden erst nach Einführung von Sephadex als Trägerstoff erzielt. Sephadex ist als Dextranpolysaccharid stark hydrophil, es quillt in Wasser oder organischen Lösungsmitteln und bildet ein Gel mit einer Vielzahl von Poren, deren Größe vom Vernetzungsgrad der Polysaccharidketten abhängt. Die Trennung beruht auf dem unterschiedlichen Diffusionsvermögen der verschiedenen Molekülgrößen in die Gelporen.

Primär wurde die Sephadex-Dünnschichtchromatographie zur Trennung von Proteinen und zur Bestimmung ihrer Molekulargewichte eingesetzt (92-102). Sie ist heute eine Standardmethode geworden. Für Proteine gilt, daß die Wanderungsstrecke einer Substanz im Dünnschicht-Gelchromatogramm, dividiert durch die Wanderungsstrecke einer Bezugssubstanz (Cytochrom C), dem Logarithmus des Molekulargewichts proportional ist. Für jede andere Stoffklasse ergibt sich eine eigene Beziehung zwischen Molekulargewicht und Wanderungsstrecke, da die Affinität der Substanzklassen zur Gelphase unterschiedlich ist. Deshalb sollen die als Bezugssubstanzen gewählten Makromoleküle (Eichsubstanzen) gleiche Molekulargewichte und Molekülgröße aufweisen wie die zu bestimmenden Makromoleküle. Unbedingte Voraussetzung ist eine räumlich einheitliche Form der Moleküle. Polysaccharide dagegen sind nach bisherigen Ermittlungen in ihrer Struktur linear oder verzweigt und uneinheitlich. Bisher gibt es unseres Wissens in der Literatur keine Arbeit, in der über die Dünnschicht-Gelchromatographie der reinen Polysaccharide berichtet wurde.

Ziel unserer Arbeit war es, die Sephadex-Dünnschichtchromatographie für den Nachweis der Rohschleime einzusetzen und eine Unterscheidung einzelner Schleime oder Schleimgruppen zu erreichen.

Gleichzeitig sollte eine Molekulargewichtsbestimmung versucht werden. Als Vergleichssubstanzen wurden die Dextrane 10/20/40/70/ und 110-Tausend ausgewählt.

Zur Herstellung der Platten ließen wir vorschriftsmäßig Sephadex G-200 Superfine mit Wasser quellen und strichen das Gel auf 20 x 20 cm Glasplatten aus. Es erfordert einige Geschicklichkeit, die viskosen Testlösungen (0.15%) aufzutragen. Wir verwendeten Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, deren Durchmesser so gewählt werden muß, daß einerseits die Startpunkte nicht zu groß werden (die Punkte verbreitern sich während der Chromatographie !) und andererseits die Schleimlösung ausfließen kann (Oberflächenspannung der Schleime !). Die Gelschicht darf durch das Aufbringen nicht verletzt werden, da an diesen

Stellen die Fließgeschwindigkeit unterbrochen wird. Die Platten mit den aufgetragenen Schleimen wurden 5 Stdn. in einer Sandwich-Kammer der Fa.Boehringer, Mannheim, mit Winkelstellung 30^0 entwickelt. Das Fließmittel war Wasser.

Schwierigkeiten bereitete auch der Nachweis der Polysaccharide, da die Mehrzahl der bekannten Nachweisreagenzien auf gleiche Art mit dem Träger der stationären Phase, dem Sephadex, reagiert.

Zum Anfärben der Schleime versuchten wir folgende Reagenzien: Rutheniumrot (103), Amidoschwarz (104), Toluidinblau (105), Mucicarmin (106,107), Procion (108). Die Schleime ließen sich aber nicht selektiv anfärben.

Wir entwickelten ein neues Anfärbeverfahren:

Wir modifizierten das zum Protein-Nachweis verwendete Abklatsch-Verfahren (109), indem wir anstelle eines trockenen Papierbogens einen feuchten, mit Natrium-Alizarinsulfonat-lösung (0.0125%) imprägnierten Filtrierpapierbogen (Schleicher u.Schüll 2043 b) benutzten.

Dieser Methode liegt die Idee zugrunde, die getrennten Komponenten von der Sephadex-Platte durch Ausnutzung von Diffusion und Adsorption auf den Papierbogen zu übertragen.

Hierzu bringt man nach erfolgter Chromatographie das zugeschnittene feuchte imprägnierte Filtrierpapier so auf die horizontal gestellte feuchte Gelplatte, daß sich keine Luftblasen bilden können. Das Papier saugt augenblicklich die Feuchtigkeit mit dem größten Teil der zu trennenden Substanzen auf. Nach 2 Minuten erscheinen die Schleime als rote Flecke (Farbkomplexbildung s.S. 47) auf dem gelblichen Papier. Sie sind lediglich bei den Samen-Schleimen etwas blaß.

Das Papier wird von der Gelplatte abgezogen und an der Luft getrocknet. Auch nach dem Trocknen verändern sich die Farbintensitäten nicht.

Das Chromatogrammbild ist in Abb. 7, S.32, wiedergegeben.

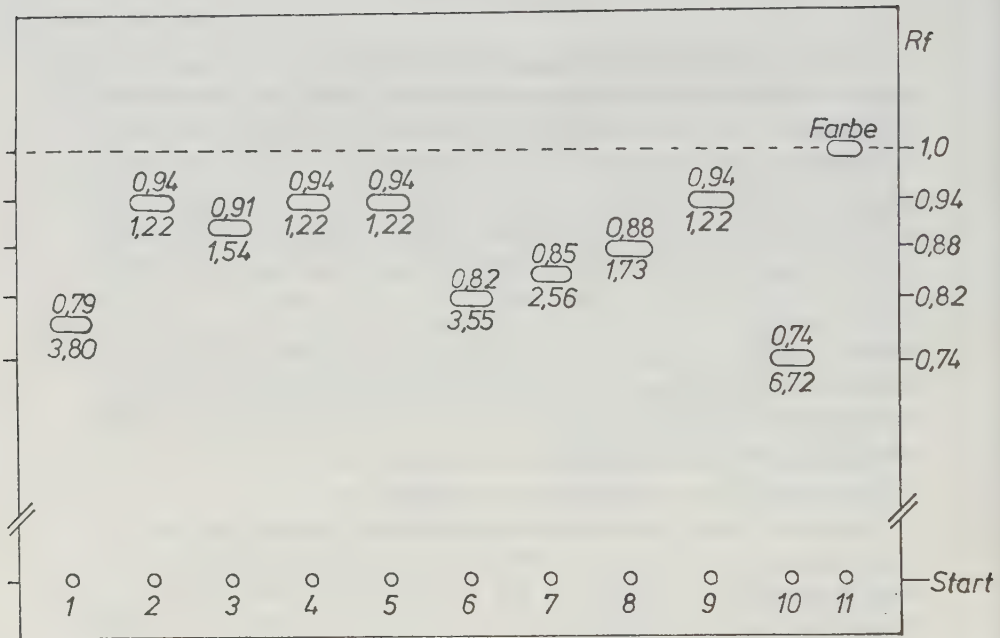


Abb. 7 Sephadex G-200 Dünnschicht-Chromatographie von Schleimen

- 1 = Semen Psyllii
- 2 = Fructus Ceratoniae
- 3 = Flores Malvae
- 4 = Folia Plantaginis
- 5 = Folia Farfarae

- 6 = Semen Lini
- 7 = Radix Althaeae
- 8 = Semen Foenugraeci
- 9 = Folia Malvae
- 10 = Semen Cydoniae
- 11 = Alizarin-Natriumsulfonat

R_F-Wert

Zeichenerklärung: Schleim



v = Viskosität (cSt)

Gel-Typ: Sephadex G-200 Superfine

selbstgestrichene Platten: 20 x 20 cm

aufgetragene Menge: je 5 µl Schleimlösung (0.15%)

Sandwich-Kammer, Boehringer Mannheim

Winkel: 30°, absteigend

Laufmittel: Wasser

Laufzeit: 5 Stdn.

Auswertung und Diskussion

Auf dem Papierabklatsch wurde die Mitte der Flecken genau ausgemessen und die Wanderungsstrecke der einzelnen Schleime auf Alizarin bezogen. Die Schleime von Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Folia Malvae und Fructus Ceratoniae liefen am weitesten, gefolgt von Flores Malvae, Semen Foenugraeci, Semen Lini und Semen Psyllii. Den niedrigsten R_f -Wert hat der Schleim von Semen Cydoniae.

Daraus läßt sich ersehen, daß die niederviskosen Schleime am schnellsten laufen, die hochviskosen am langsamsten. Der R_f -Wert eines Schleimes scheint also seiner Viskosität proportional zu sein.

Diese ersten Ergebnisse können für die Praxis bedeuten, daß mit Hilfe der Sephadex-Dünnschichtchromatographie erstmalig eine schnelle und gut reproduzierbare Methode zur Unterscheidung von Schleimstoffen gefunden wurde.

Durch die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten ist es möglich, die Schleime von Semen Psyllii, Semen Cydoniae, Semen Lini, Semen Foenugraeci und Radix Althaeae eindeutig zu identifizieren. Wegen zu ähnlicher R_f -Werte sind die Schleime von Folia Malvae, Folia Plantaginis, Folia Farfarae, Flores Malvae und Fructus Ceratoniae allerdings nicht zu unterscheiden.

Die Schwierigkeiten, die im Anfärben der Schleimstoffe bestanden, konnten durch die Anwendung eines Alizarin-Papierabklatsches gelöst werden.

Der entstandene Alizarin-Farbkomplex wird auf S. 47 beschrieben.

Der Versuch einer Molekulargewichtsbestimmung der Schleime führte zu keinem Ergebnis, da die als Eichsubstanzen verwendeten Dextrane zu geringe R_f -Wert-Unterschiede hatten. Erst genauere Kenntnis der Schleimstoffstrukturen wird es möglich machen, geeignete Eichsubstanzen zu finden, die für die Sephadex-Dünnschichtchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung der Pflanzenschleime eingesetzt werden können.

6.3 Molekulargewichtsbestimmung

Über die Molekulargewichte der Pflanzenschleime hat man vage Anhaltspunkte. So bestimmte FRANZ (12) mit dem Einkammerosmometer die Molekulargewichte der Schleime von Folia Malvae zu 62 400, von Flores Malvae zu 83 100 und von Radix Althaeae zu 113 000. Mit der Ultrazentrifuge wurde das Molekulargewicht des Schleimes aus Fructus Ceratoniae zu 310 000 ermittelt (25). Heute wird neben der Ultrazentrifugation die Gelchromatographie in Säulen zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen (110-117) und Polysacchariden (118-123) herangezogen. Es zeigte sich nämlich, daß die Elutionsvolumina der Moleküle weitgehend von ihrem Molekulargewicht abhängen; Über einen weiten Bereich ist das Elutionsvolumen eine nahezu lineare Funktion des logarithmisch aufgetragenen Molekulargewichts, so daß man aus dem Elutionsvolumen auf das Molekulargewicht schließen kann. Die zu den Bestimmungen benutzten Gele, wie Sephadex, Bio-Gel, Styragel und Agarose besitzen durch ihre Raumnetzstruktur Hohlräume, in welche die Moleküle verschiedenen schnell hineindiffundieren (vergleiche S. 29). Zwischen Molekülvolumen bzw. -durchmesser und Molekulargewicht besteht wegen der unterschiedlichen Struktur der Makromoleküle oft kein direkter Zusammenhang. Es ist deshalb notwendig, die Säule zu eichen, d.h. die Elutionsvolumina von Testsubstanzen zu ihren Molekulargewichten in Beziehung zu setzen. Da aber Makromoleküle unterschiedlichen Aufbau besitzen, fehlen vielfach geeignete Eichsubstanzen, die eng mit den zu untersuchenden Substanzen verwandt sind.

Für Schleimstoffe wurde diese Methode bisher nicht eingesetzt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung unserer Schleimstoffe verwendeten wir Bio-Gel A-0.5 m (operating range 10.000 to 500.000 mol.wt.). Wir stellten mit Dextranen der Molekulargewichte 10/20/40/70/110 und 500-Tausend als Eichsubstanzen eine Eichkurve auf, die in Abb. 8, S.35, wiedergegeben ist. Das Elutionsmittel war 0.1 M-Ammoniumformiat. Der Nachweis der Polysaccharid-Eichsubstanzen erfolgte mit der Anthron-Methode (124,125).

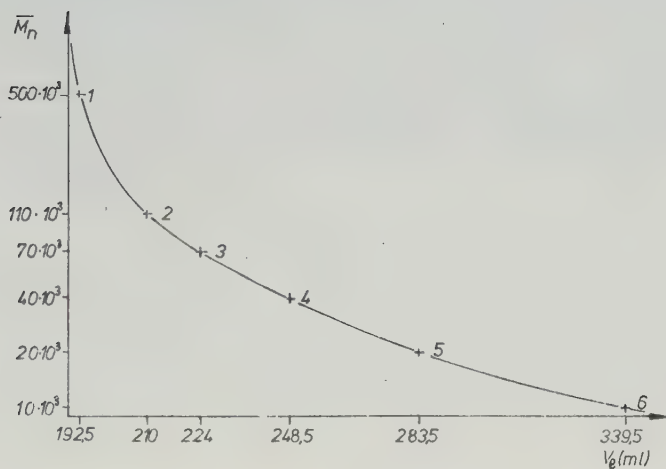


Abb. 8

Eichkurve der Dextrane

(Beziehung zwischen Elutionsvolumen V_e und logarithmisch aufgetragenen Molekulargewicht $\overline{M}_n$)

Gel-Typ: Bio-Gel A-0.5m

Säulenlänge: 100 cm

Säulendurchmesser: 2 cm

Tropfgeschwindigkeit: 10 Tropfen/Minute

Fraktionierung: 2 ml/Fraktion

Elutionsmittel: 0.1 M-Ammoniumformiat

1 = Dextran	500 000
2 = Dextran	110 000
3 = Dextran	70 000
4 = Dextran	40 000
5 = Dextran	20 000
6 = Dextran	10 000

Beim Versuch, unsere Schleimstoffe zu bestimmen, zeigte sich, daß sämtliche Polysaccharide im Ausschlußvolumen erschienen. Auch bei Verwendung von Bio-Gel A-50 m (operating range 1.000.000 to 50.000.000 mol.wt.) und Sepharose CL-6B (operating range 10.000 to 1.000.000 mol.wt.) erhielten wir die gleichen Ergebnisse. Daraus schließen wir, daß der Aufbau der Schleimmakromoleküle nicht mit dem der Eichsubstanzen vergleichbar ist. Eine Erklärung hierfür wäre die lineare Struktur der Makromoleküle (Linearkolloid) (126).

Wir unternahmen daher den Versuch, das Molekulargewicht des Schleimes aus Folia Malvae durch Ultrazentrifugation zu bestimmen. Es zeigt sich aber, daß bei einer Umdrehungszahl von 48 000 rpm die Schleimstoffe nicht sedimentieren. Eine hochtourigere Ultrazentrifuge (z.B. mit 60 000 rpm), mit der das Molekulargewicht von Fructus Ceratoniae bestimmt wurde, stand uns nicht zur Verfügung.

6.4 Elektrophorese

Mit Ausnahme der Aminos Zucker und Zuckersäuren sind Zucker elektrisch neutral. Mit geeigneten Puffersystemen bilden sie aber geladene stabile Borat(127)-, Germanat(128)-, Molybdat (129)- oder Stannat(130)-Komplexe, so daß auch Polysaccharidgemische auf Grund der unterschiedlichen Ladung ihrer einzelnen Komponenten getrennt werden können. Über derartige Trennungen von Glukanen und Mannanen (109), Mucopolysacchariden (131) und Pflaumengummen (132) ist berichtet worden.

6.4.1 Niedervoltelektrophorese

Wir versuchten, unsere Polysaccharide elektrophoretisch zu trennen. Nach einer von PADMOYO und MISEREZ (133) beschriebenen Methode verwendeten wir als Trägermaterial Celluloseacetatfolie und einen Boratpuffer (pH 10) bei einer Spannung von 200 V. Die entwickelten Pherogramme wurden mit Toluidinblau-Lösung (105) angefärbt. Es zeigte sich aber, daß die Schleimstoffe kaum wanderten. Auch die Verwendung von Glasfaserpapier und anderen Puffern, wie z.B. Borsäure (pH 9.8), Natriummolybdat (pH 5), Natriumborat (pH 10) und Natriumacetat (pH 5) brachte kein anderes Ergebnis.

6.4.2 Disk-Elektrophorese

Für den nächsten Trennversuch verwendeten wir die Disk-Elektrophorese.

Ziel unserer Arbeit war es, die Disk-Elektrophorese zur Unterscheidung einzelner Schleime oder Schleimgruppen einzusetzen. Gleichzeitig sollte eine Molekulargewichtsbestimmung versucht werden.

Die von ORNSTEIN und DAVIS (134) für Proteingemische entwickelte Trennmethode schien die optimalsten Voraussetzungen zu bieten, da die Disk-Elektrophorese den Vorteil des Konzentrierungseffekts hat, d.h. die Substanzen werden vor ihrer Trennung auf eine scharf begrenzte Zone konzentriert. Außerdem werden die Moleküle elektrophoretisch nicht nur nach ihrer elektrischen Gesamtladung, sondern auch nach ihrer Größe (Molekulargewicht) und Gestalt getrennt (Molekularsiebeffekt) (135). Bisher sind nur wenige Polysaccharide, und zwar Laminarin, Amylopectin, Sargassan und Pelve-tian (104) mit der Disk-Elektrophorese bestimmt worden. Wir beschreiben hier erstmals Trennungen von Polysacchariden an SDS-Polyacrylamidgel (SDS = sodium dodecyl sulphate).

Polyacrylamid ist ein Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und dem Vernetzer N,N-Methylenbisacrylsäureamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. Dabei bildet sich ein drei-dimensionales Maschenwerk. Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels hängen teils vom Polymerisationsgrad, teils vom Vernetzungsgrad ab. Elastische und völlig transparente Gele erhält man bei Verhältnissen um 30:1 Acrylamid zum Vernetzer, wobei die Acrylamidkonzentration bei 3% liegen muß.

Wir verwendeten eine Gelkonzentration von 10%.

Das für Proteine erprobte Gel kann Proteine vollständig in langgestreckte Moleküle entfalten. Diese liegen dann als Detergens-Peptid-Komplexe vor, die im elektrischen Feld allein nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Da unter diesen Voraussetzungen die Molekülgröße dem Molekulargewicht proportional ist, kann diese Technik mit guter Ge-

naugigkeit zur Bestimmung des Molekulargewichts herangezogen werden. Mit Hilfe einer Eichkurve, in welcher der Logarithmus des Molekulargewichts bekannter Proteine gegen die elektrische Beweglichkeit aufgetragen wird, lassen sich die Molekulargewichte bestimmen.

Da wir nach den bisherigen Ergebnissen vermuteten, daß auch die Polysaccharide als Linearmoleküle vorliegen, schien uns dieses Gel am geeignetesten.

Für die Elektrophorese wurde die von WEBER et al. (136) und von WAGEMANN (137) entwickelte Methode übernommen. Sie wurde mittels eines Shandon-Säulenelektrophoresegeräts mit Shandon-Netzgerät SAE 27-61 durchgeführt.

Die Elektrophorese erfolgte in 10 cm langen und 6 mm breiten Gelröhrchen, in welche Pufferlösung (mit SDS), Acrylamid, Methylenbisacrylamid und als Katalysatorsystem Ammoniumpersulfat und Tetramethyläthylendiamin eingefüllt wurden.

Nach erfolgter Polymerisation unter der UV-Lampe wurde der überschüssige Katalysator durch einen Elektrophoresevorlauf bei 40 mA, 30 V, 30 Minuten, entfernt. Dann wurden die Substanzlösungen aufgetragen und die Röhrchen mit dem Kammerpuffer überschichtet. Die Elektrophorese verlief bei 60 mA, 30 V, 8 Stdn.

Nach beendeter Elektrophorese konnte man deutlich graue, gelbliche und braune Zonen in den Gelröhrchen erkennen. Die grauen Zonen waren bei UV-Betrachtung noch deutlicher zu sehen. Die Gele wurden vorsichtig mit einer Injektionsnadel aus den Röhrchen gelöst und in Entwicklungslösungen überführt. Wir versuchten zunächst, die Schleime mit einer Alizarin-Natriumsulfonat(s.S.46)- und Toluidinblau(s.S.31)-Lösung sichtbar zu machen. Diese Farbstoffe erwiesen sich jedoch als ungeeignet, da sich das gesamte Gel einheitlich rot bzw. blau färbte. Wir fanden in einer Anthron-Lösung (0.05%) in 70 Vol.% Schwefelsäure, die unter Eiskühlung zu den Gelen hinzugegeben wurde, eine neue Anfärbemethode. Wir erhitzten die mit Gel und Anthron-Lösung gefüllten Reagenzgläser 5 Minuten in siedendem Wasserbad und ließen sie bei Raumtemperatur erkalten. Nach 6 Stdn. waren die grauen

Zonen intensiv grün, die gelben und braunen intensiv braun gefärbt. Da letztere nicht die charakteristische grüne Polysaccharid-Farbe zeigten, konnten wir sicher sein, daß jene von Begleitstoffen stammten, die in den Rohschleimen enthalten waren.

In Abb. 9, S.40, sind die gefärbten grünen Zonen der einzelnen Schleime wiedergegeben.

Eine Änderung der Gelkonzentration brachte keine bessere Trennung.

Auswertung und Diskussion:

Bei der Auswertung der Farbzonen stellten wir fest, daß die Schleime in die Gele hineindiffundierten, aber nur einige Schleime Zonen abtrennten. Nur deutlich verbreiterte Zonen der Startpunkte zeigten die Schleime aus Semen Cydoniae, Semen Lini, Folia Farfarae und Folia Plantaginis. Von den Schleimen aus Semen Psyllii, Radix Althaeae und Folia Malvae trennten sich eine, von den Schleimen aus Flores Malvae und Semen Foenugraeci deutlich zwei, von Fructus Ceratoniae drei Zonen ab.

Zum Vergleich wurden auch Dextrane mit den Molekulargewichten 10/20/40-Tausend einer Disk-Elektrophorese unterzogen. Wie aus Abb. 9, S.40, hervorgeht, sind somit die Schleime aus Folia Malvae, Flores Malvae, Semen Foenugraeci, Semen Psyllii und Fructus Ceratoniae mit Hilfe dieser Methoden gut von den übrigen zu unterscheiden.

Die ersten Ergebnisse zeigen, daß einige Schleime niedermolekulare Fraktionen enthalten, während die überwiegende Anzahl der Schleimstoffe Molekulargewichte von über 40-Tausend haben müßten. Es bedarf einer Optimierung des Trägermaterials, um bessere Trennungen und detailliertere Aussagen machen zu können.

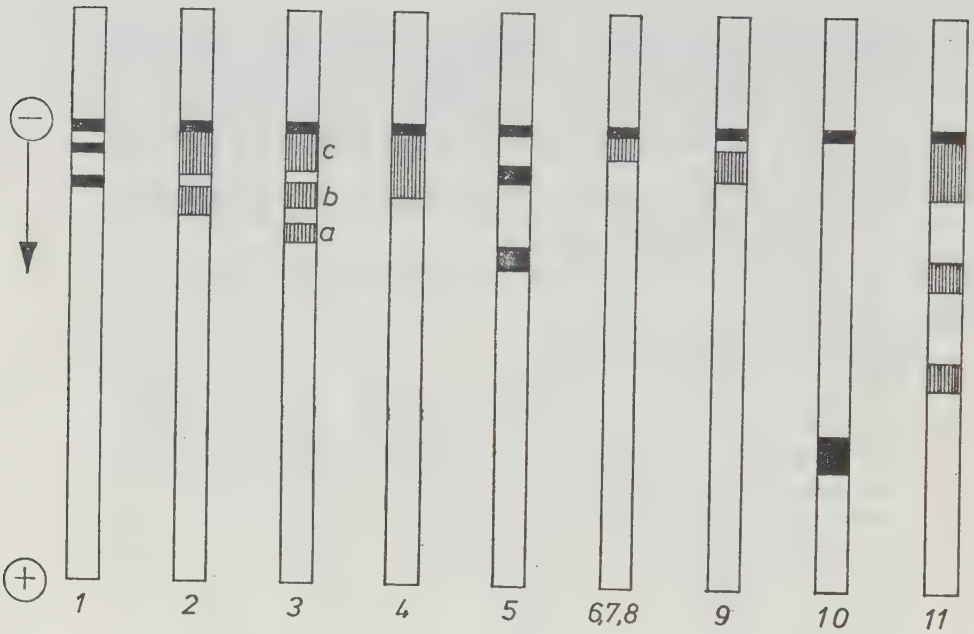


Abb. 9

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Schleime

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| 1 = Folia Malvae | 6 = Semen Cydoniae |
| 2 = Semen Psyllii | 7 = Folia Farfarae |
| 3 = Dextrane a = 10 000 | 8 = Folia Plantaginis |
| b = 20 000 | 9 = Radix Althaeae |
| c = 40 000 | 10 = Semen Foenugraeci |
| 4 = Semen Lini | 11 = Fructus Ceratoniae |
| 5 = Flores Malvae | |

Färbung: 0.05% Anthron in 70 Vol.% Schwefelsäure

6.5 Fraktionierung an DEAE-Cellulose

Da Schleime meistens ein Gemisch von mehreren Polymeren darstellen, kann der Grad der Einheitlichkeit, Heterogenität bzw. Komplexität und damit die Zusammensetzung eines Polysaccharidgemisches für einen Schleim ein Charakteristikum sein. Für die Durchführung dieser Untersuchung sind bis heute stets mehrere Verfahren notwendig, da durch eine einzige Methode keine genaue Aussage möglich ist. Erste Hinweise über die Homogenität eines Schleimes können durch Elektrophorese (138-141) und Ultrazentrifugation (25) erhalten werden.

BUTLER und STACEY (142) erzielten eine Trennung in mehrere Fraktionen, indem sie wässrige Polysaccharid-Gemische mit Äthanol versetzten.

JONES (143) und KALAC (144) konnten mit quaternären Ammoniumsalzen, wie z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTA-Br), eine Trennung in saure und neutrale Polysaccharide erreichen.

Eine weitere oft angewandte Fraktionierungsmethode kann über unlösliche Metallkomplexe erfolgen. Hierzu werden Bariumhydroxid, Kupferchlorid, -sulfat oder -acetat verwendet.

So konnte ERSKINE und JONES (19) die saure Fraktion des Samen Lini-Schleimes durch Fällung mit Kupferacetat und Äthanol in drei Fraktionen unterteilen.

FLODIN (145) und SCHLUBACH (146) beschrieben Trennmöglichkeiten von Kohlehydraten an Sephadex-Säulen.

In neuerer Zeit wurde DEAE(Diäthylaminoäthyl)-Sephadex zur Fraktionierung von Laminarin eingesetzt (147). Es konnte eine Trennung in zwei Fraktionen erzielt werden.

Gute Ergebnisse wurden mit DEAE-Cellulose-Säulen bei der Trennung von wasserlöslichen neutralen und sauren Polysacchariden erreicht. NEUKOM et al. (148) benutzten DEAE-Cellulose in der Hydroxyl-, Phosphat- und Boratform. SIDDIQUI und WOOD (149) setzten zur Polysaccharidfraktionierung DEAE-Cellulose in Carbonatform ein und eluierten mit einem Ammoniumcarbonat-Konzentrationsgradienten. Auch FRANZ (12) versuchte neben der Elektrophorese, Ultrazentrifugation, Äthanol-fällung und

CTA-Br-Trennung eine Fraktionierung des Althaeae-Schleimes an DEAE-Cellulose in der Acetatform. Er kam zu dem Ergebnis, daß der Schleim aus mindestens drei Fraktionen besteht.

SCHMOLK et al. (150) versuchten, den Fructus Ceratoniae-Schleim an DEAE-Cellulose in der Phosphatform zu trennen, erhielten aber nur eine Fraktion. Von den bisher beschriebenen Fraktionierungsmethoden für Pflanzenschleime schien uns die Ionenaustauscherchromatographie am geeignetsten.

Als Säulenfüllmaterial benützten wir die schon häufig verwendete DEAE-Cellulose in der Carbonatform (0.025 M-Ammoniumcarbonat).

Durch die Verwendung eines Puffers wird außerdem die Säule schon während des Durchlaufs ständig regeneriert, so daß sie sofort weiterverwendbar ist (151).

Die Identifizierung der Trennkurven konnte bisher nur sehr aufwendig in der Weise durchgeführt werden, daß kontinuierlich einzelne, sehr geringe Elutionsmengen gesammelt und jeweils mit Phenol (152), Carbazol (153), Cystein (154) oder Anthron (155) zu einem Farbkomplex umgesetzt wurden, dessen Farbtintensität spektralphotometrisch gemessen wurde.

Wir benutzten für die Detektion ein Differentialrefraktometer, welches mit einem Schreiber gekoppelt war.

Die Verwendung eines solchen Detektors setzt einen möglichst gleichmäßigen Durchfluß voraus. Deshalb wurde das Prinzip der Niederdruckflüssigchromatographie benutzt, wobei das von GLASL (156) beschriebene direkte Drucksystem verwendet wurde. Zur Kontrolle wurden von Zeit zu Zeit Eluate entnommen und mit Carbazol-Lösung auf die Anwesenheit von Polysacchariden geprüft. Dünnschichtchromatographisch konnten wir keine Mono- oder Oligosaccharide in den Eluaten nachweisen. Die automatische und kontinuierliche Aufzeichnung der Eluate mit dem Differentialrefraktometer bietet gegenüber der bisher möglichen Detektion den Vorteil der sofortigen Messung und und der differenzierteren Aufzeichnung, da die Anzeige je

nach Brechungsindex der eluierten Substanzen im Vergleich zum Elutionsmittel positiv oder negativ sein kann. Man erhält so unter Umständen positive und negative Kurvenbilder.

Bei der Auswertung der Chromatogramme konnten wir feststellen, daß jeder Schleim ein charakteristisches Bild ergibt.

Wie aus Abb. 10, S. 44, zu sehen ist, zeigen Radix Althaeae und Folia Plantaginis lanc. jeweils nur einen Peak im negativen Bereich. Dieser hat jedoch mit 140 (Radix Althaeae) und 180 Minuten (Folia Plantaginis) eine unterschiedliche Elutionszeit. Zwei Peaks hingegen zeigen die Schleime von Semen Foepugraeci, Flores Malvae und Folia Farfarae. Dabei sind beim Bockshornsamensamen zwei negative Peaks zu beobachten: ein relativ kleiner Peak mit der Elutionszeit von 65 und ein größerer mit der Elutionszeit von 95 Minuten. Folia Farfarae hingegen zeigt einen kleinen negativen und einen großen positiven Peak mit den Elutionszeiten 65 und 80 Minuten. Flores Malvae unterscheidet sich von Folia Farfarae dadurch, daß neben dem zweiten Peak (Elutionszeit 80 Minuten) noch eine Fraktion liegt, welche sich jedoch nur als Schulter abtrennen läßt (Elutionszeit 95 Minuten).

3 Elutionspeaks hatte Semen Lini (Elutionszeiten 65, 95, 160 Minuten). Sie unterscheiden sich dadurch, daß der 2. und größte Peak in der positiven Zone liegt, während der von Fructus Ceratoniae im negativen Bereich liegt. Allein im Malvenblätter-Schleim konnten 4 Elutionspeaks nachgewiesen werden. Davon besitzen die beiden positiven die Elutionszeiten 100 und 150 Minuten, während die Peaks mit den Elutionszeiten 120 und 175 Minuten einen negativen Ausschlag ergeben.

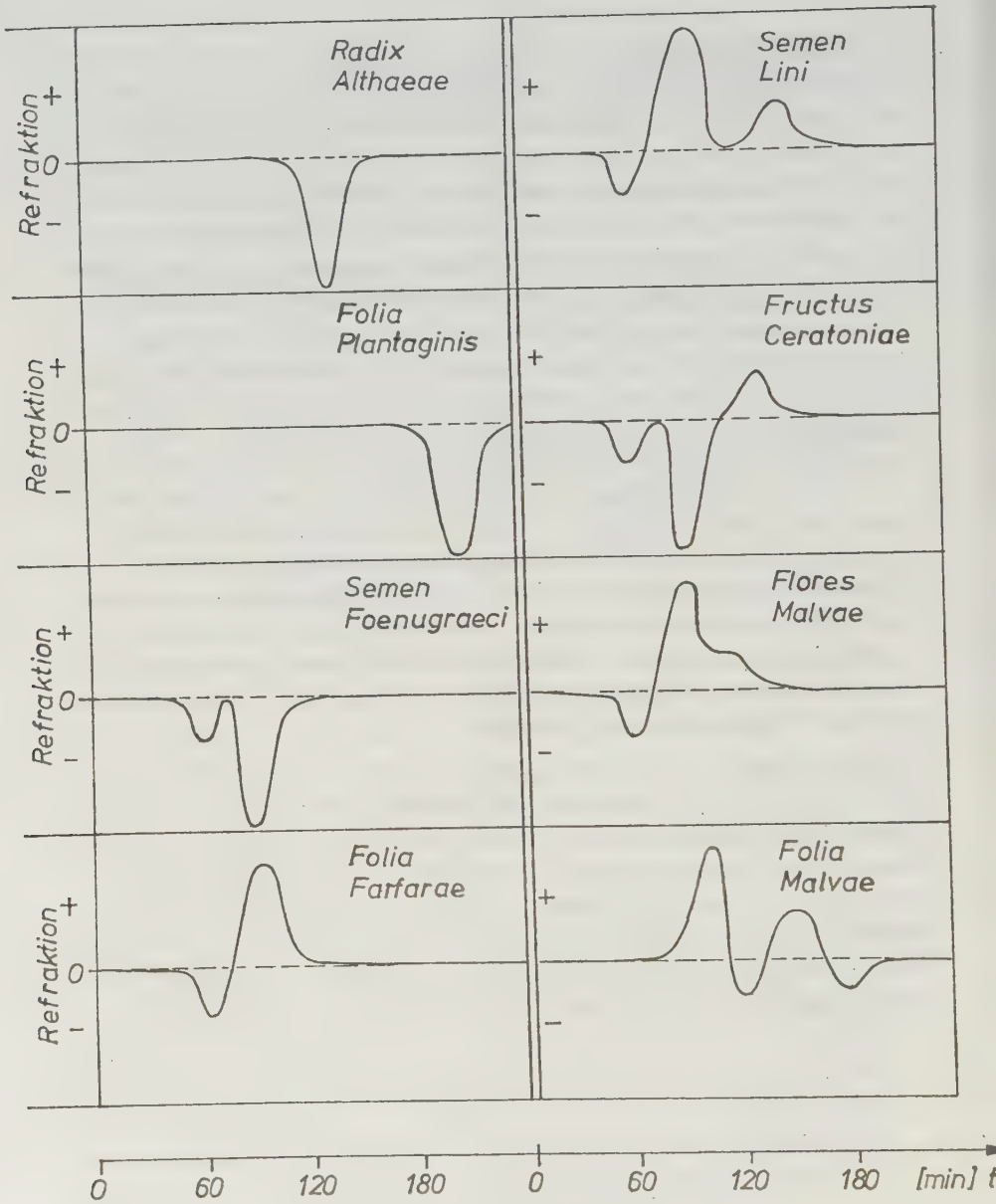


Abb. 10

Bilder von Schleimen, an DEAE-Cellulose getrennt

Bei den Schleimen aus Semen Cydoniae und Semen Psyllii konnten keine meßbaren Fraktionen nachgewiesen werden. Der Grund hierfür dürfte in der schlechten Löslichkeit dieser mehr oder weniger nur quellfähigen Polysaccharide liegen.

Ergebnis

Wie aus Abb. 10, S.44, ersichtlich, ist es möglich, Schleimstoffe an DEAE-Cellulose in Carbonatform in einzelne Fraktionen zu unterteilen. Durch die Verwendung eines Differentialrefraktometers in Verbindung mit einem Schreiber ist eine weitere Differenzierung der Elutionspeaks gegeben, da auf Grund unterschiedlicher Refraktionen positive und negative Peaks erscheinen. Um die Reproduzierbarkeit dieser Fraktionierungsmethode zu gewährleisten, wurden mehrere Säulenfüllungen verwendet. Es ergaben sich jeweils die gleichen Peaks mit vergleichbaren Elutionszeiten.

Die Untersuchung von Schleimen aus Drogen unterschiedlicher Herkunftsländer (Folia Malvae aus Jugoslawien, Holland, Ungarn, Bulgarien) zeigte keinerlei Unterschiede.

Es ist also möglich, auf einfache und reproduzierbare Weise die Schleime von Radix Althaeae, Folia Plantaginis lanceolatae, Folia Malvae, Folia Farfarae, Flores Malvae, Semen Foenugraeci, Semen Lini und Fructus Ceratoniae auf Grund der unterschiedlichen Elutionszeiten und Detektion zu unterscheiden. Nur die Schleime von Semen Cydoniae und Semen Psyllii zeigen keine meßbaren Peaks.

Unsere Ergebnisse sind mit den früheren Untersuchungen nur bedingt vergleichbar. Während wir bei Semen Lini in Übereinstimmung mit den Arbeiten von ERSKINE und JONES (19) ebenfalls 2 Fraktionen nachweisen konnten, erhielten wir im Gegensatz zu FRANZ (12) bei Radix Althaeae nur eine einzige zu eluierende Fraktion. Bei Fructus Ceratoniae jedoch waren 3 Elutionspeaks nachweisbar, während SCHMOLK (150) nur über eine Fraktion berichtet.

Wie schon erwähnt, genügt diese Trennmethode noch nicht, um die strukturelle Heterogenität eines Schleimes vollkommen nachzuweisen. Hierzu sind noch weitere Verfahren notwendig.

6.6 Aschegehalt

Die Arzneibücher lassen bei Schleimdrogen den Aschegehalt bestimmen, um Verunreinigungen und Verfälschungen durch Schönmungsmittel (z.B. CaCO_3) oder Beschwerungsmittel (z.B. BaCO_3) bzw. durch andere Drogenbeimengungen zu erkennen und nachzuweisen.

In der Literatur gibt es keine Angaben über den Aschegehalt der Pflanzenschleime selbst. Da der Aschegehalt wichtige Informationen über die Herkunft liefern und unter Umständen zur Charakterisierung herangezogen werden kann, haben wir den Aschegehalt aller Schleime bestimmt.

Aus der Gegenüberstellung der Aschegehalte von Drogen und Schleimen (s.Tab. 3, S.14) ist ersichtlich, daß sich diese in etwa entsprechen, d.h. die Aschegehalte der Blattdrogen und die daraus isolierten Blattschleime sind sehr hoch. Der auffallend hohe Wert (74%) bei Folia Farfarae wird dagegen mit Sicherheit zu einem größeren Teil von Verunreinigungen verursacht, da hier die Haare der Blätter als sog. "Schmutzfänger" (siehe DAB 7/BRD) fungieren.

Mittlere Aschewerte ergaben die Schleime aus Radix Althaeae (24.7%), Flores Malvae (16.1%) und Fructus Ceratoniae (19.1%). Deutlich niedriger sind mit 6 - 12% die Ascheanteile der Semenschleime. Die Bestimmung des Aschegehaltes ist somit ein zusätzlicher Hinweis auf den Reinheitsgrad der Drogen. Da der Aschegehalt der Blatt-, Blüten-, Frucht- und Samen-Schleime voneinander abweicht, lassen sich zumindest Schleimgruppen unterscheiden.

6.7 Bildung eines Farbkomplexes mit Alizarin-Natriumsulfonat

Auf der Suche nach einem geeigneten Anfärbereagenz für die dünnenschichtchromatographisch aufgetrennten Schleime fanden wir, daß alle Schleimlösungen mit Alizarin-Natriumsulfonat einen purpurroten Farbkomplex bildeten (s.S. 31).

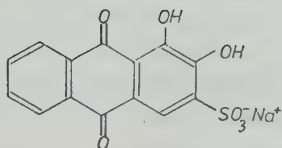


Abb. 11

Alizarin-Natriumsulfonat

Summenformel: $C_{14}H_7NaO_7S$

Molekulargewicht: 342,26

Alizarin-Natriumsulfonat, das Natriumsalz der 1,2-Dihydroxy-anthrachinon-3-sulfonsäure, wurde früher (verbreitet) als Beizenfarbstoff verwendet, da es mit Metallionen charakteristische Farbblacke liefert. Mit Calcium entsteht ein purpurroter, mit Aluminium ein rosaroter, mit Magnesium ein violetter und mit Barium ein blauer Chelatkomplex (157,158).

Man kann sich diesen Komplex folgendermaßen vorstellen:

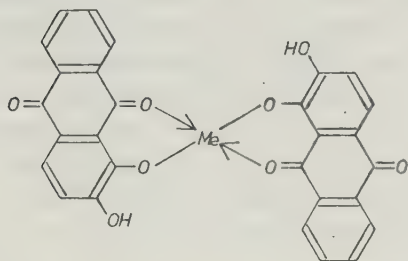


Abb. 12

Alizarin-Chelatkomplex

Da diese Komplexbildung spektrophotometrisch auswertbar ist, haben wir entsprechende Versuche unternommen. Alle Schleime (0.2%) bildeten mit Alizarin-Natriumsulfonat einen purpurroten Farbkomplex, der bei 520 nm ein Maximum hatte. Interessanterweise war die Komplexbildung umso intensiver, je mehr Calcium in den Schleimen vorhanden war.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8, S.49, zusammengestellt. Bei den Schleimen aus Flores-, Folia-, Radix- und Fructus-Drogen erhielten wir stark gefärbte Komplexe, während bei

den Semenschleimen aus Linum, Foenugraecum, Psyllium und Cydonia die Farbintensitäten in dieser Reihenfolge abnehmen. Für eine quantitative Bestimmung läßt sich die Reaktion mit Alizarin-Natriumsulfonat jedoch nicht verwenden, da die Schleime mit Wasser nur kolloidale Lösungen bilden und die für die Farbkomplex-Bildung verantwortlichen Ca-Ionen aus den Schleimen erst allmählich in Freiheit gesetzt werden.

Dies konnte durch die Ca-Bestimmung einer Malven-Schleimlösung nach verschiedenen Zeiten (1,2,3,4 Tage) bestätigt werden.

Der Alizarin-Schnelltest gibt aber erste Hinweise, ob es sich um die Gruppe der Folia-, Flores-, Radix- und Fructus-Schleime (Extinktionsbereiche von 0.29-0.42) oder um die Gruppe der Samen-Schleime (Extinktionsbereiche von 0.12-0.21) handelt.

6.8 Über den Ca-, Mg-, Na- und K-Gehalt der Schleime

Es ist bekannt, daß Kationen die Solvation der Schleimstoffe beeinflussen (159,160); Carrageen z.B. bildet mit KCl, Alginate mit Calcium ein Gel. Zweiwertige Ionen, wie Calcium und Magnesium dehydratisieren stärker und wirken auf das entstehende Gel strukturstabilisierender als einwertige Ionen (161). In unseren Schleimen konnten Calcium, Magnesium, Kalium und Natrium nachgewiesen werden. Da diese Ionen möglicherweise die Viskosität entscheidend beeinflussen, wurden sie quantitativ bestimmt. In der Literatur gibt es keine Angaben über die mineralische Zusammensetzung der Schleime.

Die Bestimmung dieser Ionen erfolgte durch komplexometrische Titration, Flammen- und Feldemissionsspektralanalyse.

In Tabelle 8, S.49, sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Alle Schleime enthielten Ca, Mg, Na und K in unterschiedlicher Konzentration. So fanden wir in allen Blatt-, Wurzel- und einigen Samenschleimen (Lini, Psyllii) hauptsächlich Calcium, in den Schleimen der Malvenblüten und Quittensamen vorwiegend Kalium. Schon LARCHER (162) und BAUMEISTER (163) haben festgestellt, daß in Blättern bevorzugt Calcium und Magnesium, in den Blüten, Früchten und Samen Kalium gespeichert werden.

T a b e l l e 8

Farbkomplex mit Alizarin-Natriumsulfonat und Kationengehalt der Schleime in %

Schleim aus Droge	Extinktion des Farbkomplexes bei 520 nm	Kationen			
		Ca ⁺² (a,b)	Mg ⁺² (a,b)	Na ⁺ (c)	K ⁺ (c)
Radix Althaeae	0.29	4.78	2.42	0.34	4.41
Folia Farfarae	0.34	11.75	--	--	--
Folia Plantaginis	0.44	10.27	--	--	--
Folia Malvae(Ungarn)	0.41	8.61	1.30	0.078	5.39
Folia Malvae(Jugoslaw.)	0.40	8.40	--	--	--
Folia Malvae(Holland)	0.41	9.50	--	--	--
Flores Malvae	0.42	5.56	1.51	0.092	6.89
Fructus Ceratoniae	0.37	6.33	--	--	--
Semen Lini(Belgien)	0.21	1.60 1.46	0.035	0.011	0.27
Semen Lini(Marokko)	0.20	1.50 1.36	0.10	--	0.20
Semen Psyllii	0.14	0.71	0.11	0.04	0.12
Semen Cydoniae	0.12	0.81	1.05	0.054	1.47
Semen Foenugraeci	0.20	0.37	--	--	--

-- = wurde nicht bestimmt, da für unsere Betrachtung ohne zusätzlichen Informationswert

a = komplexometrische Titration

b = Atomabsorptionsspektralanalyse (AAS)

c = Flammenemissionsspektralanalyse (FES)

Der Tabelle 8 ist zu entnehmen, daß Schleime von gleichen Drogen verschiedener Herkunft ziemlich gleichen Calciumgehalt besitzen. Der Schleim aus ungarischen Malvenblättern enthielt 8.61%, aus jugoslawischen 8.4% und aus niederländischen 9.5% Calcium.

Ebenfalls gleiche Calciumwerte erhielten wir für die Linumschleime aus Drogen verschiedener Anbauggebiete. Die Werte schwanken für eine belgische und marokkanische Droge nur innerhalb der Grenzen 1.36% und 1.60% Ca.

Aus den folgenden Vergleichszahlen geht hervor, daß sich ein Zusammenhang zwischen der Viskosität der Schleime und ihrem Calcium-Gehalt nicht herstellen läßt:

Folia Farfarae	$\eta = 1.2$ cSt	Ca = 11.75%
Semen Psyllii	$\eta = 4.15$ cSt	Ca = 0.71%
Semen Foenugraeci	$\eta = 1.51$ cSt	Ca = 0.37%

Die Viskosität bei Folia Plantaginis ($\eta = 1.21$ cSt; Ca = 10.27%) nimmt nach der Dialyse (vergleiche S. 27) ($\eta = 1.23$ cSt; Ca = 3.75%) trotz Verringerung des Calciumgehaltes nicht ab. Das gleiche gilt auch für Semen Lini (vor der Dialyse $\eta = 2.45$ cSt; Ca = 1.6% - nach der Dialyse $\eta = 2.77$ cSt; Ca=1.25%).

6.9 Diskussion der bisherigen Ergebnisse

Die Charakterisierung der einzelnen Schleime ist möglich, wenn man von reinen Schleimen ausgeht. Die von uns durchgeführten Bestimmungsmethoden erlauben zusätzlich zu der sonst üblichen Viskositätsmessung eine noch weiter gehende Charakterisierung.

Erste Hinweise erhält man durch den Alizarin-Schnelltest (siehe S. 46). Alle Schleime, außer jenen aus den Samen-Drogen, lassen sich mit Alizarin-Natriumsulfonat intensiv rot anfärben.

Bei der Dünnschicht-Gelchromatographie (siehe S. 29) können die Schleime aus Folia- und Fructus-Drogen durch ihre größeren R_f -Werte von den übrigen Schleimen unterschieden werden.

Mit Hilfe der Disk-Elektrophorese (siehe S. 37) waren die Schleime von Folia und Flores Malvae, Semen Psyllii, Semen Foenugraeci und Fructus Ceratoniae gut voneinander zu unterscheiden.

Eine reproduzierbare Methode zur Identifizierung der Schleime, die Fingerprint-Charakter hat, ist schließlich ihre Fraktionierung an DEAE-Cellulose.

Durch die automatische und kontinuierliche Aufzeichnung der Eluate mit dem Differentialrefraktometer, der an einen Schreiber gekoppelt war, gelang eine differenzierte Aufzeichnung der Schleime. Für alle Schleime, bis auf jene von Samen

Cydoniae und Semen Psyllii, erhielten wir unterschiedliche Kurven-Bilder.

Eine weitere Eingrenzung der Schleime ist durch die zusätzliche Bestimmung der Asche- und Calciumgehalte möglich.

T a b e l l e 9

Zusammenfassende Übersicht zur Schleimidentifizierung

Schleim aus Droge	cSt	Alizarin- Intensität	R _f Sephadex	Asche in %	Ca ⁺²
Radix Althaeae	2.47	++	0.85	24.7	4.78
Folia Farfarae	1.17	+++	0.94	74.1	11.75
Folia Plantaginis	1.23	+++	0.94	36.2	10.27
Folia Malvae	1.20	+++	0.94	38.8- 40.2	8.4- 9.5
Flores Malvae	1.53	+++	0.91	16.0	5.55
Fructus Ceratoniae	1.20	+++	0.94	19.0	6.23
Semen Lini	2.45	+	0.82	6.8- 7.3	1.5- 1.6
Semen Psyllii	2.29	+	0.79	6.5	0.71
Semen Cydoniae	4.15	+	0.74	10.0	0.81
Semen Foenugraeci	1.51	+	0.88	12.1	0.37

+ = Farbintensität

7. Charakterisierung der Schleime über ihre Hydrolyseprodukte

7.1 Versuche zur Strukturermittlung

Die klassische Methode zur Strukturermittlung von Polysacchariden besteht in der Permethylierung, Hydrolyse und Identifizierung der verschiedenen Monosaccharidmethylläther.

Auf diesem Wege erhält man wertvolle Informationen über die Art der Monomerbausteine, ihre Konfiguration, den Ort und den Grad der Verzweigung.

Wir permethylierten die Schleime aus Semen Lini und Folia

Malvae. Von den vielen bekannten Methylierungsmethoden (164-166) wählten wir die Methoden nach KUHN (167) und HAKOMORI (168) aus und kombinierten sie. Wir methylierten zuerst nach KUHN, d.h. wir suspendierten die Polysaccharide in Dimethylformamid und setzten sie mit Methyljodid und Silberoxid um. Nach dünn-schichtchromatographischer Trennung und Isolierung der teilweise methylierten Polysaccharide wurden diese anschließend nach HAKOMORI permethyliert: Nach diesem Verfahren stellt man durch Reaktion von Natriumhydrid und Methylsulfoxid das Methylsulfinylcarbanion her, das die Polysaccharide in ihre Natriumsalze umwandelt, die dann mit Methyljodid permethyliert werden können. Die Reaktionsprodukte wurden dünn-schichtchromatographisch untersucht und isoliert. Wir erhielten als Produkt eine gelbe harzige Substanz, die wie das Infrarotspektrum zeigte, voll methyliert war. Die Polysaccharide hydrolysierten wir mit N-Schwefelsäure (140°C , 1 atü, 2 Stdn.).

Die methylierten Monosaccharide können säulen-, papier-, dünn-schicht- oder gaschromatographisch getrennt werden. Wir entschieden uns für die Gaschromatographie, denn mit den anderen Methoden bereitet die Trennung von isomeren Methyläthern Schwierigkeiten. Da die Polysaccharide aus verschiedenen Zuckern aufgebaut sind und jeder Zucker mit bis zu 4 Peaks im Gaschromatogramm auftreten kann (s.S. 62), war eine Anzahl sich überlappender Peaks zu erwarten. Deshalb wurden die Methylzucker nach BJÖRNDAL et al. (169) mit Natriumborhydrid zu Alditolen reduziert, so daß nach ihrer Acetylierung gaschromatographisch nur noch ein Peak für jeden Zucker gefunden wurde. Bei der Auswertung der Spektren ergab sich aber, daß sich dennoch einige Peaks überlappten und daher nicht identifiziert werden konnten.

7.2 Hydrolyseverfahren

(1) Schwefelsaure Hydrolyse

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, Polysaccharide mittels Untersuchung ihrer Hydrolysate zu charakterisieren. Dieses Verfahren ist jedoch nur dann geeignet, wenn die

Hydrolyse quantitativ verläuft und keine partiellen Zerstörungen der Zucker bzw. Resynthesen zu Oligosacchariden auftreten (170-172) bevor stabilere Verknüpfungen gespalten werden. Die Spaltungsgeschwindigkeit ist abhängig von dem hydrolysierenden Medium, von der Temperatur, dem möglicherweise angewandten Druck und der Dauer der Hydrolyse. Sie ist aber auch abhängig von der Molekülgröße, der Ringgröße der Einzelzucker, der Konfiguration (α - oder β -Form), der Art der glykosidischen Bindung (1-2-, 1-3-, 1-4-, 1-6-Verknüpfung) und von funktionellen Gruppen.

Wegen der unterschiedlichen Bindungsverhältnisse ist es schwierig, ein für alle Polysaccharide gleich brauchbares Hydrolyseverfahren zu finden.

So konnten wir in einem Vorversuch den Schleim von Samen Lini mit $\text{N-H}_2\text{SO}_4$ bereits nach 3 Stdn. quantitativ spalten, während es unter gleichen Bedingungen mit dem Schleim aus Folia Malvae nicht gelang. Wir versuchten ohne Erfolg, diesen Schleim mit HCl- und H_2SO_4 -Konzentrationen von 0.1 N bis 2.0 N und mit Kilianimischung (173) bei Temperaturen von 80°C - 100°C unter Rückflußkühlung bei Hydrolysezeiten von 30 Minuten bis zu 24 Stdn. zu spalten. Erst im Autoklav ($\text{N-H}_2\text{SO}_4$, 140°C , 2 atü, 2 Stdn.) gelang die Aufspaltung des Malven-Schleimes.

Zur Ermittlung der erforderlichen Spaltungsbedingungen haben wir den Hydrolyseverlauf durch die Aufnahme einer Hydrolysekurve festgelegt, wobei die quantitative Bestimmung der Einzelzucker gaschromatographisch über ihre Alditolacetate erfolgte.

Die Zuckerkonzentration (am Beispiel Samen Lini) in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer ist in Tabelle 10, S.54, und graphisch als Hydrolysekurve in Abb. 13, S.55, wiedergegeben.

Für die Schleime aus Flores Malvae, Folia Malvae, Samen Cydoniae und Samen Psyllii konnten wir denselben oder einen ähnlichen Hydrolyseverlauf feststellen. Damit ist eine optimale, d.h. quantitative Hydrolyse für alle Schleime im Autoklav durch eine 2stündige Behandlung bei 140°C und 2 atü möglich.

T a b e l l e 10

Zuckerkonzentration in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer (gas-chromatographisch als Alditolacetate bestimmt) am Beispiel Samen
Lini

<u>Zucker:</u>	Integratoreinheiten			
	30 Min.	60 Min.	120 Min.	180 Min.
Rhamnose	7729	41371	59210	21298
Fucose	2178	8984	12146	3801
Arabinose	1691	6002	9495	3076
Xylose	10851	34954	48038	13999
Galaktose	5017	17113	33982	8530
Glucose	1800	6402	14813	3573

(2) Trifluoressigsäure Hydrolyse

In gleicher Weise eignet sich Trifluoressigsäure (174) (2 N, 120°C, 1 atü, 1 Stde.) zur Aufspaltung der Polysaccharide. Die flüchtige Säure wird nach der Hydrolyse am Rotationsverdampfer entfernt. Dies ist im Hinblick auf uronsäurehaltige Polysaccharide vorteilhaft, da sonst die Uronsäure bei der Neutralisation abgetrennt wird. Ein weiterer Vorteil ist der geringe Substanzbedarf (10 mg). Außerdem kann die Zuckeranalyse in einem Testkölbchen durchgeführt werden. Dies ist vor allem wichtig für die quantitative Bestimmung (s.S. 61).

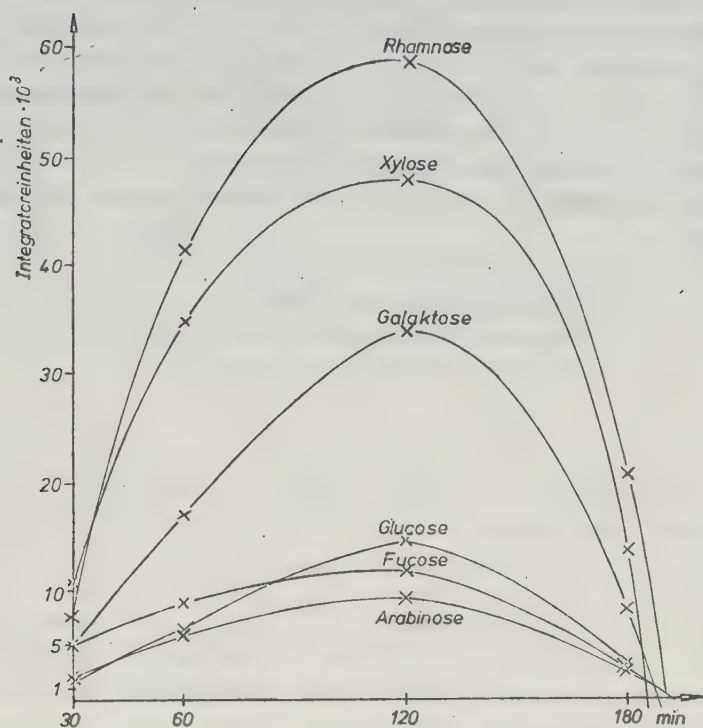


Abb. 13

Zuckerkonzentration in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer (gaschromatographisch als Alditolacetate bestimmt) am Beispiel Samen
Lini

8. Zucker- und Uronsäurebestimmung

8.1 Qualitativer Nachweis der Zucker und Uronsäure

Eine Differenzierung der einzelnen Schleime anhand der qualitativen Zuckerzusammensetzung ist nur möglich, wenn diese sich im Zucker deutlich unterscheiden. Wir haben deshalb die in den Hydrolysaten enthaltenen Zucker und die Uronsäure papier-(175,176) und dünnschichtchromatographisch (177-183) mit Hilfe von Referenzsubstanzen bestimmt.

Zucker und Uronsäure wurden mit folgenden Reagenzien nachgewiesen:

- a) Anilin-Phthalat (184,185)
- b) Anisidin-Phthalat (186)
- c) Diphenylamin-Phosphorsäure (187)
- d) Thymol-Schwefelsäure (188)

T a b e l l e 11

Färbungen der Zucker und Uronsäure mit Reagenzien

Reagenz	a	b	c	d
Zucker:				
Hexosen	ocker-gelb	grün	blau	hell-rosa
Pentosen	rot-braun	rot-violett	grau-braun	violett-rot
Methylpentosen	grünlich	braun-gelb	grau-braun	orange-rosa
Uronsäure	bräunlich	braun	grün	violett-rosa

In Abb. 14, S.57, ist das Zuckerchromatogramm der Testsubstanzen wiedergegeben. In Tabelle 12, S.58, sind die Zucker der verschiedenen Schleimhydrolysate eingetragen.

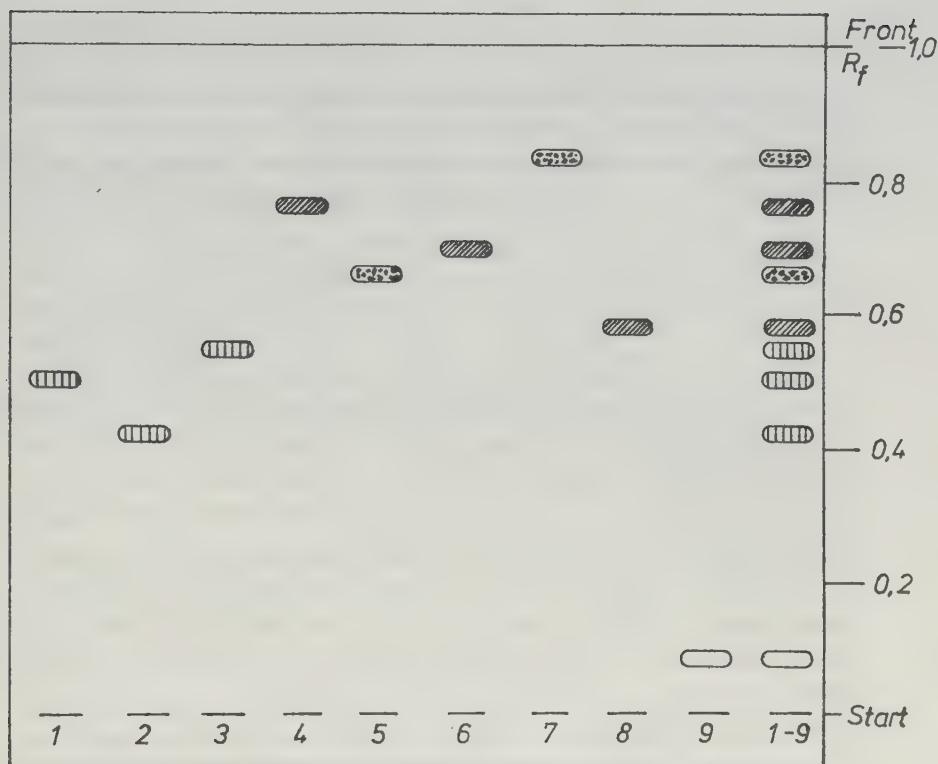


Abb. 14 DC-Schema der Testsubstanzen

Adsorbens: Cellulose-Dünnschichtfolie

1 = Glucose

6 = Xylose

2 = Galaktose

7 = Rhamnose

3 = Mannose

8 = Arabinose

4 = Ribose

9 = Galakturonsäure

5 = Fucose

1-9 = Testgemisch

 ockergelb

 grünlich

 rot-braun

 bräunlich

Laufmittel: Äthylacetat/Pyridin/Wasser (2:1:2 (0))

Sprühreagenz: Anilin-Phthalat

T a b e l l e 12

Hauptbestandteile der Polysaccharide nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung

Polysaccharid	Methyl- pentosen		Aldo- pentosen		Aldo- hexosen			Uronsäure	Cyclit
	Rhamnose	Fucose	Xylose	Arabinose	Glucose	Galaktose	Mannose	Galakturon- säure	Inosit
Radix Althaeae	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Folia Farfarae	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Folia Plantaginis	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Folia Malvae	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Flores Malvae	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Fructus Ceratoniae	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Semen Lini	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Semen Psyllii	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Semen Cydoniae	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Semen Foenugraeci	+	-	+	+	-	+	+	-	-

+ = vorhanden

- = nicht vorhanden

Auswertung und Diskussion

Wie man aus der Tabelle 12, S.58, ersehen kann, lagen in allen Schleimhydrolysaten Rhamnose, Xylose und Galaktose vor, während Arabinose, Glucose, Mannose, Fucose, Galakturonsäure und Inosit nur bei einigen Schleimen, und Ribose überhaupt nicht nachzuweisen waren.

Inosit ist kein Hydrolyseprodukt der Polysaccharide, sondern wie wir dünnschichtchromatographisch feststellten, eine Begleitsubstanz, die bei der Isolierung der Schleime mit in die Ausfällung gelangt.

Das Schleimhydrolysat aus Radix Althaeae enthielt die von FRANZ (12,15) und KARAWYA (14) beschriebenen Zucker: Rhamnose, Arabinose, Glucose, Galaktose. Wir fanden zusätzlich Xylose und Inosit. Die von den Autoren angegebene Galakturonsäure konnten wir nicht nachweisen.

Im Folia Farfarae-Schleim wiesen wir neben den bekannten Monosacchariden; Xylose, Arabinose, Glucose, Galaktose (38) noch Mannose, Rhamnose und Inosit nach. Dagegen konnten wir nicht Galakturonsäure, Fructose und Fucose nachweisen.

Der Nachweis dieser Zucker durch andere Autoren (39,40) beruht unseres Erachtens möglicherweise auf einer Verwechslung mit Mannose und Rhamnose infolge der Verwendung schlecht trennender Fließmittel.

Der Schleim aus Folia Plantaginis besteht aus Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Glucose, Galaktose und Inosit. In der Literatur gibt es bisher keine Angaben über die Zusammensetzung dieses Polysaccharids.

In den Schleimen aus Folia und Flores Malvae fanden wir außer den bekannten Zuckern (14,15): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose und Galaktose noch Mannose und Inosit. Die angegebene Galakturonsäure konnten wir nicht identifizieren.

In der Literatur (85) werden für Fructus Ceratoniae Fructose, Galaktose, Xylose, Mannose und Glucose angegeben. Zusätzlich ermittelten wir noch Rhamnose, Arabinose und Inosit, konnten aber keine Fructose ermitteln.

Von den in früheren Arbeiten (32,33) bestimmten Zuckern und der Uronsäure des Schleimes aus Semen Lini konnten wir bis auf Arabinose ebenfalls Rhamnose, Fucose, Xylose, Glucose, Galaktose und Galakturonsäure nachweisen.

Der Semen Psyllii-Schleim baut sich nach ANDERSON (17) und KARAWYA (14) aus Rhamnose, Xylose, Arabinose und Galakturonsäure auf. Wir fanden außerdem noch Glucose und Galaktose. Galakturonsäure konnten wir nicht ermitteln.

Laut Literatur (30) soll der Schleim aus Semen Cydoniae sich aus Xylose, Arabinose, Glucose, Galaktose und Galakturonsäure zusammensetzen. Wir ermittelten zusätzlich Rhamnose, konnten aber Arabinose und Galakturonsäure nicht nachweisen.

Nach den Angaben der Literatur (26,27) besteht der Schleim aus Semen Foenugraeci aus Galaktose- und Mannose-Bausteinen. Zusätzlich fanden wir Rhamnose, Xylose und Arabinose.

Die Schleime von Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Flores und Folia Malvae und Fructus Ceratoniae kann man dünnschichtchromatographisch nicht voneinander unterscheiden, da sie die gleichen Zuckerbausteine enthalten (Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose, Galaktose, Mannose und Inosit).

Gut differenzieren lassen sich die Semenschleime:

Während im Schleim aus Semen Cydoniae Rhamnose, Xylose, Glucose und Galaktose vorliegen, enthält der Schleim aus Semen Lini zusätzlich Fucose und Galakturonsäure. Der Schleim aus Semen Psyllii beinhaltet außer den auch im Schleim aus Semen Cydoniae gefundenen Zuckern noch Arabinose. Im Schleim aus Semen Foenugraeci fehlt dagegen Glucose.

Die Schleime der Malvaceen Malva und Althaea unterscheiden sich in ihrer qualitativen Zusammensetzung. Folia und Flores Malvae enthalten Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose, Galaktose, Mannose und Inosit. Im Schleim aus Radix Althaeae fehlt demgegenüber die Mannose. Bei den Vertretern der Plantagina-ceae findet sich bei Psyllium Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose und Galaktose; bei Plantago sind außerdem Mannose und Inosit vorhanden.

Bei Samen Foenugraeci sind Rhamnose, Arabinose, Galaktose und Mannose, im Schleim aus Fructus Ceratoniae außerdem noch Glucose und Xylose ermittelt worden.

Die qualitative Zuckeranalyse der verschiedenen Schleimhydrolysate läßt erkennen, daß eine Unterscheidung bzw. Identifizierung auf Grund der gleichen Zucker nur in einigen Fällen gelingt.

8.2 Quantitative Zuckerbestimmung

Nun versuchten wir, differenziertere Aussagen über die quantitative Bestimmung der einzelnen Zuckerkomponenten zu erhalten.

8.2.1 Spektrophotometrie

(1) Papier- und Dünnschichtchromatographie

Die quantitative Zuckerbestimmung von Schleimen erfolgte bisher - soweit sie beschrieben wurde - durch papier- oder dünnschichtchromatographische Auftrennung der Hydrolysate, Elution der einzelnen Komponenten und ihre spektrophotometrische Bestimmung nach der Umsetzung mit geeigneten Reagenzien (12,14,15,38).

Die Ortung der einzelnen Zucker nach chromatographischer Auftrennung ist auf Grund einer Reihe von Fremdeinflüssen nicht immer gewährleistet. Diese können z.B. bewirken, daß Wanderungsunterschiede zwischen Testgemisch und Probe entstehen, verursacht durch ungleiche Konzentration der einzelnen Komponenten in Test und Probe oder durch Depression wegen Fremdionen.

Zum anderen gibt die Anfärbung nur eines Probestreifens auf dem Chromatogramm in keiner Weise darüber Auskunft, inwieweit sich die angefärbte Substanz wirklich geradlinig über den ungefärbten Rest des Chromatogramms fortsetzt. Das schwierigste und bis heute noch nicht gelöste Problem der quantitativen Bestimmung ist das der verlustfreien Wanderung der Substanz.

Auch bei der spektrophotometrischen Bestimmung ergeben sich Ungenauigkeiten, die bedingt sind durch den Mangel an spezifischen Farbentwicklungen und durch die unter-

schiedlichen Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Zuckerchromophore. Insgesamt gesehen sind diese Bestimmungsmethoden umständlich und zeitraubend.

(2) Ionenaustauscherchromatographie

Komplexe Zuckergemische werden in neuerer Zeit als Kohlehydratboratkomplexe über Ionenaustauscher (189, 190) getrennt und photometrisch gemessen. Da sich mit dieser Methode die Uronsäuren nicht erfassen lassen und, wie oben erwähnt, der photometrischen Ermittlung Ungenauigkeiten anhaften, haben wir die quantitative Zuckerbestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie durchgeführt.

8.2.2 Gaschromatographie

8.2.2.1 Zuckeralditolacetate

Freie Zucker lassen sich gaschromatographisch direkt nicht bestimmen. Sie müssen in flüchtige Derivate überführt werden. Die Kohlehydrate werden hierzu methyliert (191), acetyliert (192), fluoroacetyliert (193), silyliert (194-199), in Butanborate (200) überführt oder ihre Aldoxime acetyliert (201) oder silyliert (202,203).

Da jeder Zucker in bis zu 4 Formen (Pyranose-, Furanose-, α - und β -Form) auftreten kann, überlagern sich bei Trennungen komplizierter Zuckergemische etliche Peaks der Derivate und können nicht ausgewertet werden. Wird jedoch das Isomergemisch mit NaBH_4 zum Alditol reduziert und erst anschließend derivatisiert, so ergibt sich für jeden Zucker nur ein definierter Peak (204).

Die besten Erfolge aller bisher beschriebenen Möglichkeiten ergab die Trennung der Alditolacetate nach der Methode von SLONEKER (205) an einer ECNSS-M-Säule.

Die Bestimmung der Galakturonsäure ist mit dieser Methode nicht durchführbar, da bei der Neutralisation der schwefelsauren Hydrolyse (s.S. 74) mit Bariumcarbonat die Uronsäure als Bariumgalakturonat mit ausfällt und im Rückstand verbleibt.

Die Ermittlung der quantitativen Zuckerzusammensetzung der Schleime erfolgte über die molaren Mengenverhältnisse. Da die einzelnen Zucker unterschiedliche Detektorempfindlichkeit besitzen, mußten Korrekturfaktoren ermittelt werden, wobei jeweils Glucose (bzw. Galaktose) als Standardsubstanz benutzt wurde.

Der Reaktionsverlauf der Glucose zum Glucitolacetat ist in Abb. 15, S. 64, dargestellt.

In Abb. 16, S. 66, ist das Gaschromatogramm der Alditolacetattestsubstanzen (molare Mengen) wiedergegeben.

Identifizierung der Peaks

Die Identifizierung von Rhamnose, Fucose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose, Glucose und Inosit erfolgte durch Überspritzen mit authentischen Substanzen bzw. auf Grund der relativen Retentionszeiten in Bezug auf den inneren Standard (= Glucose bzw. Galaktose).

Der Berechnung der molaren Mengenverhältnisse wurde die Glucose als Bezugssubstanz (Faktor 1.00) zugrunde gelegt.

Für den Schleim, der keine Glucose enthielt (Semen Foenugraeci), wurde Galaktose als Bezugssubstanz verwendet. Um die Korrekturfaktoren in Bezug auf Glucose festzustellen, wurde ein Gemisch molarer Mengen analysiert.

Aus den Peakflächen wurden die Korrekturfaktoren berechnet:

$$\text{Korrekturfaktor } f = \frac{\text{Fläche} \cdot \text{Zucker}}{\text{Fläche} \cdot \text{Glucose}}$$

Mit Hilfe der Korrekturfaktoren wurden in den acetylierten Zuckergemischen der Schleime die einzelnen molaren Zucker nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zucker (molar)} = \frac{\text{Fläche Zucker} \cdot \text{Glucose (molar)}}{\text{Fläche Glucose} \cdot f}$$

Aus den molaren Mengen der Zucker und ihren Molekulargewichten errechnete sich der prozentuale Anteil der einzelnen Zucker.

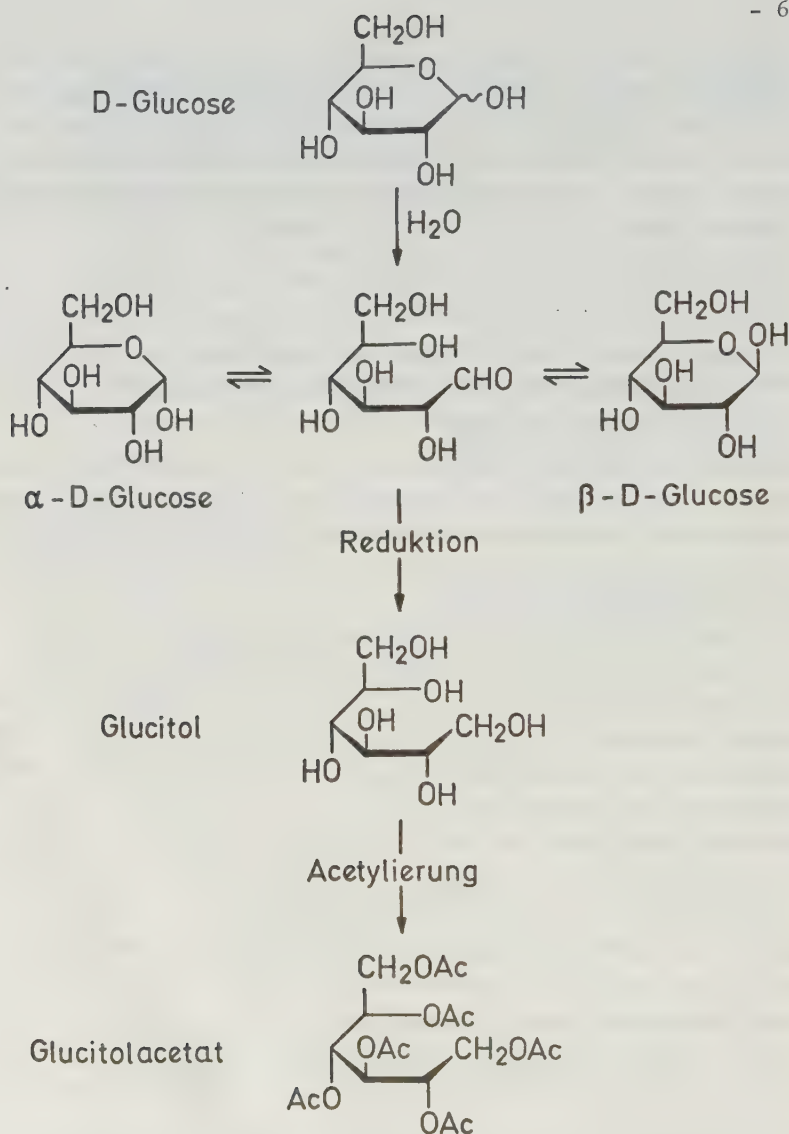


Abb. 15

Umsetzung zum Prinzip der Alditolacetat-Darstellung am Beispiel der Glucose

In Tabelle 13 sind die Gesamtretentionszeiten, relative Retentionszeiten und die Korrekturfaktoren der peracetylierten Zucker zusammengefaßt.

Die quantitative Bestimmung der Zucker über ihre Alditolacetate konnte jedoch nicht als optimal angesehen werden, da wir feststellten, daß durch ~~Neutralisation~~, Reduktion und Acetylierung unkontrollierbare Zersetzungen und Verluste auftraten.

Wir suchten deshalb nach einer besseren gaschromatographischen Bestimmungsmethode.

T a b e l l e 13

Gesamtretentionszeiten, relative Retentionszeiten und Korrekturfaktoren der peracetylierten Zucker

Zucker	Gesamtretentionszeit (Min.)	Relative Retentionszeit *)	Korrekturfaktor f (Mittelwert)
Rhamnose	10.0	0.36	0.46
Fucose	10.6	0.38	0.88
Ribose	14.0	0.50	0.38
Arabinose	14.6	0.52	1.05
Xylose	18.0	0.65	0.94
Mannose	24.0	0.87	1.27
Galaktose	25.8	0.93	1.49
Glucose	27.6	1.00	1.00
Inosit	30.4	1.10	1.21

*) Glucose = 1.00

GASCHROMATOGRAPHIE

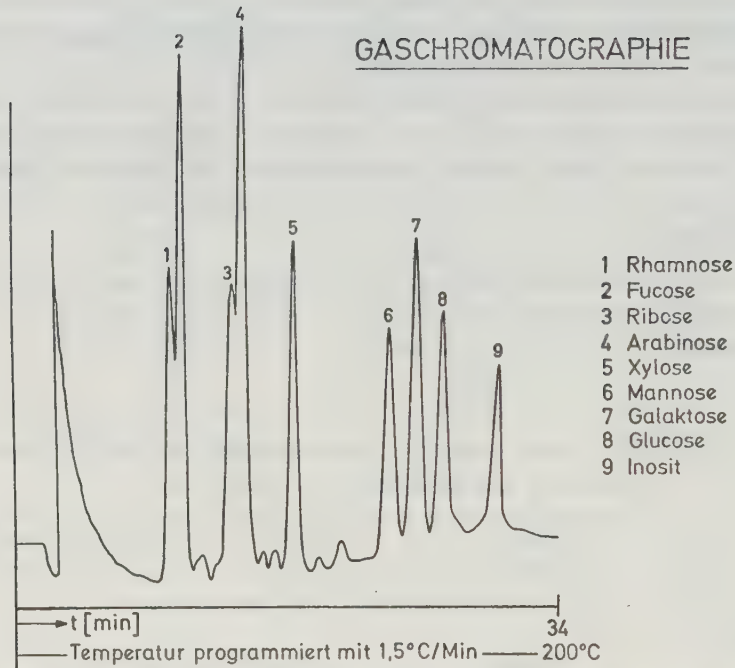


Abb. 16 Zuckeralditolacetate - ECNSS-M 3% auf Gaschrom Q

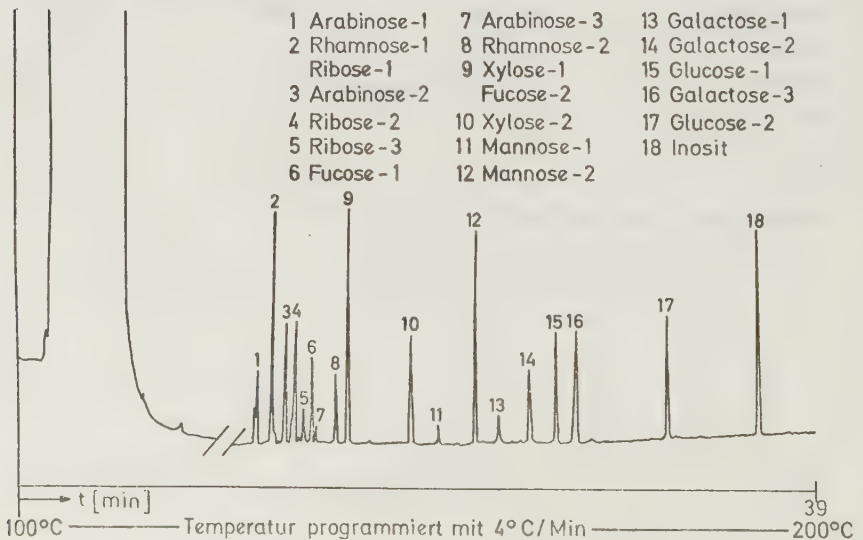


Abb. 17 Zuckertrimethylsilyläther - Dünnsfilm-Glas-Kapillare
Silikon SF 96

8.2.2.2 Zuckertrimethylsilyläther

Nachdem bereits zahlreiche Arbeiten über die gaschromatographische Zuckertrennung über ihre Silyläther (194-199) veröffentlicht wurden, versuchten wir dieses Verfahren auch für unsere Zuckerbestimmungen einzusetzen. Anstelle von gepackten Säulen, die geringe Trennfähigkeiten besitzen, verwendeten wir die wesentlich besser trennende Dünnfilm-Glas-Kapillare (206). Unseres Wissens ist bisher über die Trennung von Zuckern mit Kapillarsäulen noch relativ wenig berichtet worden (207,208). Wir verwendeten erstmals eine Dünnfilm-Kapillare, die mit Silikonöl SF 96 belegt war. Wie bei den Alditolacetaten bestimmten wir für die Silyläther der Rhamnose, Fucose, Ribose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose, Glucose und des Inosits zunächst die Gesamt- und die relativen Retentionszeiten, dann die Korrekturfaktoren (siehe Tabellen 14 und 15, S. 68).

Aus der Tabelle 15 ist zu ersehen, daß sich für jeden der untersuchten Zucker - charakterisiert durch verschiedene Indices - ein bis drei Peaks ergeben.

Das Auftreten mehrerer Peaks für denselben Zucker ist auf die verschiedenen Konformationsisomere (α -, β -, Pyranose-, Furanose-Form) zurückzuführen. Im allgemeinen hat man mit 2 bis 3 Peaks zu rechnen, da die anderen Verbindungen unter 1% liegen (209).

Im Gaschromatogramm (Abb. 17, S. 66) erschienen von Inosit 1 Peak, von Rhamnose, Xylose, Mannose, Glucose und Fucose 2 Peaks und von Arabinose 3 Peaks.

Wie die Retentionszeiten zeigen, ließen sich nicht alle Peaks trennen. So erhielten wir für Xylose-1 und Fucose-2 die gleichen Retentionszeiten. Die quantitative Bestimmung des Schleimes aus Samen Lini war infolge Überlappung dieser Peaks erschwert. Dieses Problem lösten wir, indem wir in mehreren Einzelbestimmungen das Peakverhältnis für Fucose: Xylose berechneten. Nachdem dieses weitgehend konstant war, konnte im Schleim aus dem Verhältnis der Peakflächen von Fucose-1 und Xylose-2 die Mischpeakfläche rechnerisch mit hinreichender Genauigkeit in ihre Einzelbestandteile aufgelöst werden.

T a b e l l e 14

Gesamtretentionszeiten und relative Retentionszeiten der persilylierten Zucker

Zucker	Gesamt-Retentionszeit (Minuten)	Relative Retentionszeit *)
Arabinose-1	18.5	0.63
Rhamnose-1	19.0	0.65
Ribose-1	19.0	0.65
Arabinose-2	19.5	0.66
Ribose-2	19.8	0.67
Ribose-3	20.3	0.69
Fucose-1	20.6	0.70
Arabinose-3	20.8	0.71
Rhamnose-2	21.3	0.72
Xylose-1	22.0	0.74
Fucose-2	22.0	0.74
Xylose-2	24.2	0.82
Mannose-1	25.2	0.85
Mannose-2	26.6	0.90
Galaktose-1	27.3	0.93
Galaktose-2	28.5	0.96
Glucose-1	29.5	1.00
Galaktose-3	30.2	1.03
Glucose-2	33.6	1.14
Inosit	37.0	1.24

*) Glucose-1 = 1.00

T a b e l l e 15

Korrekturfaktoren f der persilylierten Zucker, bezogen auf Glucose

Rhamnose	0.94	Mannose	0.93
Fucose	0.86	Galaktose	0.92
Ribose	0.82	Glucose	1.00
Arabinose	0.81	Inosit	0.85
Xylose	1.08		

Auswertung

Aus der Tabelle 16, S. 71, und der graphischen Darstellung Abb. 18, S. 72, ist zu ersehen, daß die Schleime in ihren Zuckern deutliche quantitative Unterschiede zeigen. Die Schleime aus Radix Althaeae, Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Semen Lini, Semen Psyllii, Semen Cydoniae und Semen Foenugraeci unterscheiden sich erheblich. Die schon qualitativ nicht zu differenzierenden Schleime aus Fructus Ceratoniae, Flores und Folia Malvae sind auch quantitativ in ihrem Zuckergehalt ähnlich.

Vergleicht man die prozentualen Zuckeranteile der Folia Malvae-Schleime aus verschiedenen Anbaugebieten, so stellt man fest, daß sie ähnlich sind. Gleiche Ergebnisse liefern Semen Lini-Proben aus Belgien und Marokko.

Der Fructus Ceratoniae-Schleim hatte nicht das in der Literatur angegebene Galaktose:Mannose-Verhältnis von 1:3 bis 1:7, sondern genau das umgekehrte. Das kann daran liegen, daß in unserer Droge eine Mischung aus Fruchtschale und Samen vorlag. Das Galaktomannan, das die Autoren beschrieben, wurde aus dem Samen isoliert.

Im Semen Foenugraeci-Schleim soll das Verhältnis Galaktose:Mannose 5:6 betragen (64). Wir fanden die Zusammensetzung von 3.5 : 4.8.

Die quantitative Zusammensetzung von Schleimen innerhalb einer Familie ist sehr ähnlich. Schon beim bloßen Betrachten der Diagramme, Abb. 18, S. 72, fällt auf, daß in den Malva-ceenschleimen aus Radix Althaeae, Folia und Flores Malvae vor allem Rhamnose und Galaktose vorhanden sind.

Bei den Folia Malvae-Schleimen verschiedener Herkunft (Ungarn, Holland, Bulgarien und Jugoslawien) und den Semen Lini-Schleimen aus Belgien und Marokko ist weitgehende Übereinstimmung in allen Zuckern zu beobachten.

Demnach scheint die Zusammensetzung der Schleimstoffe bis zu einem hohen Grad eine familienspezifische Eigenschaft zu sein.

Bei der Familie der Plantaginaceen war die Übereinstimmung nicht so groß, denn in Samen Psyllii findet sich im Gegensatz zu Folia Plantaginis viel Xylose. Die unterschiedlichen Ergebnisse können daraus resultieren, daß wie in den Blättern der Liliatae statt der Assimilationsstärke lösliche Zucker (210) auftreten, die mitisoliert wurden.

Auch bei der Ordnung der Fabales fällt die Zuordnung schwer, da der Schleim aus Fructus Ceratoniae (im Gegensatz zu dem aus Samen Foenugraeci) aus Fruchtschale und Samen gewonnen wurde.

Bei dem Asteraceen-Schleim fallen die großen Mengen Arabinose (33.10%) und Galaktose (33.50%), bei dem Rosaceen-Schleim der hohe Xylose- (35.70%) und Glucose- (38.40%)Anteil auf.

In der Übersichtstabelle 17, S. 73, sind die eigenen Ergebnisse (a) und die der Autoren FRANZ (b (12), c (15), d (38)) und KARAWYA (e (14)) zusammengefaßt. Obwohl die quantitative Bestimmung der Zucker mit verschiedenen Methoden durchgeführt wurde, sind Übereinstimmungen vorhanden.

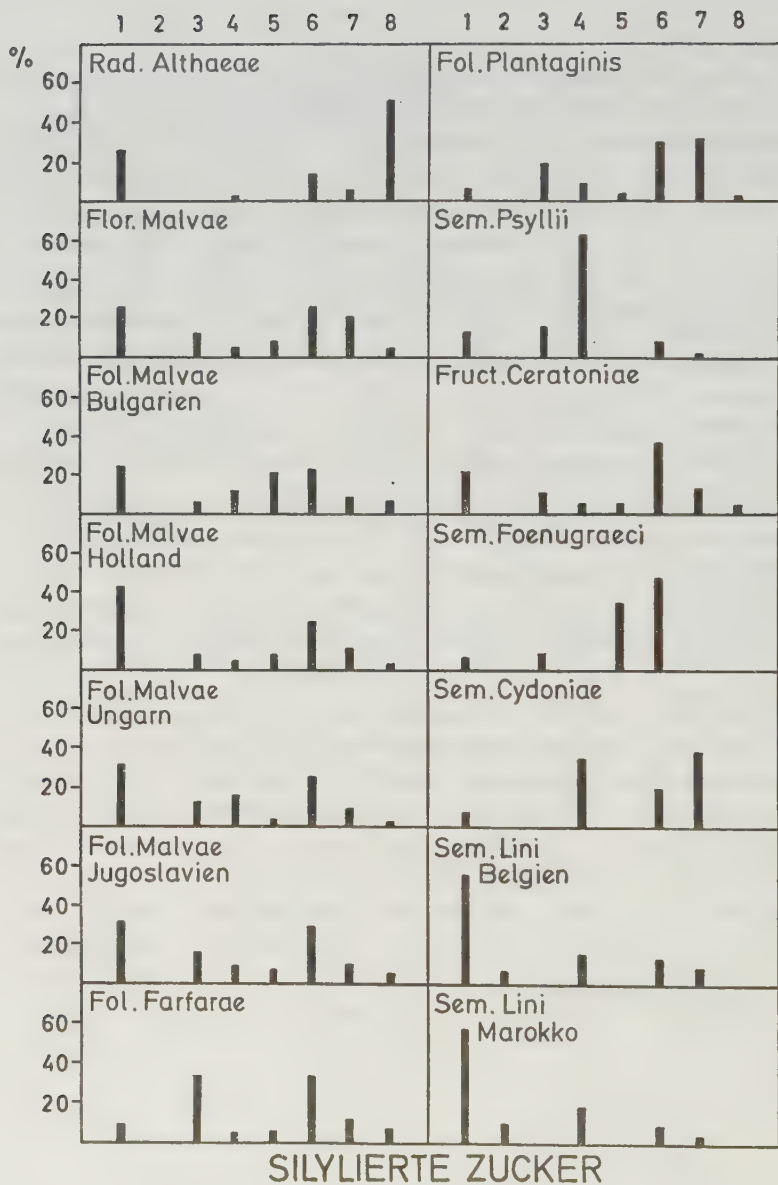
Abweichende Ergebnisse können daraus resultieren, daß wir bei unseren Bestimmungen eine stärkere Differenzierung vorgenommen haben. Bei Radix Althaeae wurden Inosit, bei Folia und Flores Malvae Mannose und Inosit mitausgewertet. Bei den Schleimen aus Folia Farfarae kamen Rhamnose, Mannose und Inosit, bei dem Schleim aus Samen Psyllii Galaktose und Glucose hinzu. KARAWYA (e) fand für alle Schleime einen hohen Galakturonsäureanteil (zwischen 13 und 22%). Seine Ergebnisse stimmen nicht mit den unsrigen überein, da wir nur im Schleim von Samen Lini Galakturonsäure (6.1%) nachweisen konnten (siehe S. 74).

T a b e l l e 16

Silylierte Zucker der Schleime in %

Schleim aus Droge	Zucker							
	Rhamnose	Fucose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galaktose	Glucose	Inosit
Radix Althaeae	37.70	neg	5.60	1.30	neg	23.80	15.60	21.60
Flores Malvae	26.30	neg	12.22	4.17	7.01	25.88	20.82	3.60
Folia Malvae (Bulgarien)	24.12	neg	5.92	11.38	20.53	22.50	8.39	7.10
Folia Malvae (Holland)	42.18	neg	6.89	4.80	5.75	25.77	11.21	3.40
Folia Malvae (Ungarn)	30.67	neg	12.40	16.52	3.34	25.80	8.90	2.30
Folia Malvae (Jugoslawien)	32.26	neg	15.70	9.34	7.90	29.60	10.50	4.70
Folia Farfarae	8.60	neg	33.10	3.90	4.70	33.50	11.90	4.30
Folia Plantaginis	6.80	neg	18.18	9.00	3.92	29.11	30.99	2.00
Fructus Ceratoniae	21.40	neg	10.58	5.67	5.52	38.67	12.70	5.21
Semen Psyllii	12.40	neg	16.18	62.40	neg	7.37	1.65	neg
Semen Foenugraeci	6.50	neg	8.09	1.32	35.39	48.70	neg	neg
Semen Cydoniae	6.20	neg	neg	35.70	Spur	19.70	38.40	neg
Semen Lini (Belgien)	55.80	6.60	neg	15.32	neg	13.39	8.89	neg
Semen Lini (Marokko)	58.06	9.70	neg	19.40	neg	9.11	3.73	neg

neg = nicht nachweisbar



SILYLIERTE ZUCKER

Abb. 18

%-Gehalt der Zuckerkomponenten (bestimmt über die Silyläther)

- 1 = Rhamnose
- 2 = Fucose
- 3 = Arabinose
- 4 = Xylose

- 5 = Mannose
- 6 = Galaktose
- 7 = Glucose
- 8 = Inosit

T a b e l l e 17

Zusammensetzung der Schleime(in %):Eigene Ergebnisse (a) und die der Autoren (b,c,d,e)

Schleim aus Autor Zucker									
Droge		Rhamnose	Fucose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galaktose	Glucose	Inosit
Radix Althaeae	a	37.70	neg	5.60	1.30	neg	23.80	15.60	21.60
	b	28.70	--	10.40	--	--	43.20	17.70	--
	c	34.00	--	4.90	--	--	46.40	14.70	--
	e	20.01	--		35.16	--		22.16	--
Flores Malvae	a	26.30	neg	12.22	4.17	7.01	25.88	20.82	3.60
	b	26.20	--	20.20	2.50	--	37.20	16.80	--
	e	8.28	--	15.17	27.39	--	34.00	--	--
Folia Malvae (Ungarn)	a	30.67	neg	12.40	16.52	3.34	25.80	8.90	2.30
	b	15.00	--	24.20	5.10	--	46.40	9.30	--
	e	13.00	--	13.50	23.25	--	34.25	--	--
Folia Farfarae	a	8.60	--	33.10	3.90	4.70	33.50	11.90	4.30
	d	--	--	21.10	10.50	--	23.60	14.70	--
Folia Plantaginisinis	a	6.80	neg	18.18	9.0	3.92	29.11	30.99	2.00
Semen Psyllii	a	12.40	neg	16.18	62.40	neg	7.37	1.65	neg
	e	13.20	--	17.50	45.80	neg	--	--	--
Fructus Cera-toniae	a	21.40	neg	10.58	5.67	5.52	38.67	12.70	5.21
Semen Foenu-graeci	a	6.50	neg	8.09	1.32	35.39	48.70	neg	neg
Semen Cydoniae	a	6.20	neg	neg	35.70	Spur	19.70	38.40	neg
Semen Lini (Belgien)	a	55.80	6.60	neg	15.32	neg	13.39	8.89	neg

neg = nicht nachweisbar

-- = nicht bestimmt

Die Nachteile der photometrischen Bestimmung der Zucker, welche die Autoren durchführten, sind auf S. 61 beschrieben. Auch die gaschromatographische Methode arbeitet nicht verlustfrei. Die Fehler dieser Bestimmung liegen bei 5%. Fructose und Galakturonsäure werden zum größten Teil von dem Säulenmaterial adsorbiert. Als geeignetste Methode sehen wir die gaschromatographische Bestimmung der Zucker als Silyläther an. Hierfür spricht die Art des Hydrolyseverfahrens und der Derivatisierung sowie die Verwendung einer Dünnschicht-Glas-Kapillare mit einem neuartigen Adsorbens von außerordentlicher Trennleistung. An unserem Beispiel konnten wir zeigen, daß selbst komplizierte Zuckergemische, bestehend aus 8 verschiedenen Komponenten (Arabinose, Rhamnose, Fucose, Xylose, Mannose, Galaktose, Glucose und Inosit) optimal zu trennen sind. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Empfindlichkeit und die schnelle Durchführbarkeit der Analyse. Wie Abb. 17, S.66, zeigt, kann die Trennung in 40 Minuten durchgeführt werden.

Zwischen Viskosität und quantitativer Zuckerzusammensetzung eines Schleimes besteht kein Zusammenhang.

8.3 Quantitative Uronsäurebestimmung

In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben über die Galakturonsäuregehalt in den Schleimen. So fand FRANZ (12) in Radix Althaeae 27.8%, KARAWYA (14) 38.7%. Im Schleim von Folia Farfarae konnte FRANZ (38) 5.8% finden, während HAALAND (40) 67.9% bestimmte. Aus dem Schleim von Folia Malvae konnte FRANZ (12) 19.1% und KARAWYA (14) 18.78% Galakturonsäure ermitteln. Für Flores Malvae werden 24.2% (12) und 16.9% angegeben. Im Schleim von Semen Lini sollen nach RUTKOWSKI (211) 58.2% enthalten sein. Für den Semen Psyllii-Schleim werden 21.9% (14) und 13% (17) angegeben. Während methylierte und unmethylierte Hexuronsäuren im Schleim aus Semen Cydoniae gefunden wurden, sollen dagegen im Schleim aus Semen Foenugraeci und Fructus Ceratoniae keine Uronsäure vorhanden sein.

Der qualitative Nachweis und vor allen Dingen die quantitative Bestimmung der Uronsäure in Pflanzenschleimen ist bis heute

noch nicht befriedigend gelöst. Die Hauptschwierigkeit liegt wiederum in der Hydrolyse-methode, da es nur schwer möglich ist, die störenden Begleitsubstanzen abzutrennen. Die Möglichkeit, die freie Uronsäure über den durch Decarboxylierung freigesetzten CO_2 -Gehalt zu bestimmen (212,214), ist bei Polysacchariden sehr problematisch. Wie CASTAGNE(215) am Beispiel der Rhamnose, die durch Einwirkung von 19%iger HCl ca. 1% CO_2 bildete, nachwies, können auch normale Zucker CO_2 und CO abspalten. Eine Bestimmung der Galakturonsäure, die von FRANZ (12,38) nach dieser Methode bei den Rohschleimen verschiedener Pflanzen durchgeführt wurde, muß aus diesen Gründen in Frage gestellt werden. Er erzielte so z.B. für Folia Farfarae 5.8%, für Radix Althaeae 27.8%, für Folia Malvae 19.1% und für Flores Malvae 24.2% Galakturonsäure.

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist die photometrische Bestimmung der Uronsäure nach Umsetzung mit Carbazol (216), Oricinol (217), Naphthoresorcin (218), Anthron (219), Phenol (220) oder Cystein (221). Hiernach ist eine Bestimmung der Uronsäure in einem Rohschleim sogar in Gegenwart von Pentosen, Methylpentosen und Hexosen möglich, da die Entwicklungen der Farbkomplexe Zeitdifferenzen aufweisen und auch unterschiedliche Absorptionsmaxima zeigen. Quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Zucker können dagegen die Extinktionen entscheidend beeinflussen. Außerdem befinden sich in dem Untersuchungsmaterial häufig gefärbte Begleitstoffe, die die Messungen beeinflussen können.

Eine kolorimetrische Bestimmung der Galakturonsäure in verschiedenen Rohschleimen aus Radix Althaeae nach der Methode von DISCHE (216) mit Carbazol ergab einen Gehalt von 26.8-38.7% (15). KARAWYA (14) bestimmte nach der Methode von DUBOIS (205) die einzelnen Zucker und Uronsäure von Semen Psyllii, Radix Althaeae, Folia Malvae und Flores Malvae nach papierchromatographischer Auftrennung und Elution. Widersprüchlich sind die gewählten Hydrolysebedingungen bei FRANZ (15) und KARAWYA (14). FRANZ konnte die Galakturonsäure nur unter drastischen Bedingungen im Autoklav ($2 \text{ N-H}_2\text{SO}_4$, 120°C , 1 atü, 2 Stdn.) abspalten, während KARAWYA mit einer bedeutend

milderen Hydrolyse ($\text{N-H}_2\text{SO}_4$, Wasserbad 20 Stdn.) ähnlich hohe Ausbeuten erzielte. Da außerdem für den dünnsschicht- und papierchromatographischen Nachweis der Galakturonsäure kein spezifisches Nachweisreagenz (Naphthoresorcin) verwendet wurde, sondern nur universelle Sprühreagenzien wie Anilin-Phthalat, Anisidinhydrochlorid oder alkalische Silbernitratlösung, ist fraglich, ob auch wirklich nur Uronsäure eluiert und nicht auch andere Polysaccharidspaltprodukte mitbestimmt wurden.

Für unsere eigenen Untersuchungen versuchten wir zunächst, die optimalen Hydrolysebedingungen festzulegen, indem wir Zeit, dann Druck und Temperatur änderten.

Da mit diesen Versuchen die Uronsäure nicht nachgewiesen werden konnte, verwendeten wir zur Hydrolyse Schwefelsäure in verschiedenen Konzentrationen, die Kiliani-Mischung (173) und Dowex-50 (222). Aber auch hiermit ließ sich die Uronsäure nicht ermitteln. Eine Spaltung mit methanolischer Salzsäure (196) erbrachte sehr viele dünnsschichtchromatographisch nachweisbare Artefakte. WULFF (195) hat 1964 eine Doppelbestimmung vorgeschlagen, wobei in einem Falle vor der Hydrolyse der mit Diazomethan (223) hergestellte Methylester mit NaBH_4 zur Aldose reduziert wird. Nach Hydrolyse und anschließender Reduktion und Acetylierung erhält man einen Gesamtpeak, der aus der eigentlichen Aldose und der reduzierten Uronsäure besteht. Im anderen Falle entfernt man die Uronsäure nach der Hydrolyse des Polysaccharids mit Dow I. Im Hydrolysat befinden sich nur die eigentlichen Aldosen. Aus der Differenz der beiden Bestimmungen läßt sich dann neben den Aldosen auch die Uronsäure bestimmen. Es gelang uns aber nicht, die Methylester der im Polysaccharid gebundenen Uronsäure herzustellen, da sich das Polysaccharid in den zur Umsetzung erforderlichen Lösungsmitteln Äther oder Chloroform nicht löste. Mehr Erfolg erwarteten wir von einer Methode, bei der die Uronsäure nach der Hydrolyse als Bariumuronat abgetrennt und die Uronsäure über den Ionenaustauscher Dowex (H^+) wieder in Freiheit gesetzt wird (224). Auch diese Methode zeitigte keine befriedigenden Ergebnisse, weil im Hydrolyse-

rückstand neben der Uronsäure trotz gründlichen Auswaschens große Mengen an Zuckern adsorbiert blieben. Sie lösten sich mit der Uronsäure in Ammoniak. Erst die gaschromatographische Abtrennung der Uronsäure führte zu einem befriedigenden Ergebnis. Dazu wurden die Polysaccharide nach ALBERSHEIM (174) mit 2 N-CF₃COOH (s.S. 54) hydrolysiert, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und mit TMSi-S-Universalreagens (Fa. Serva, Heidelberg) silyliert. Die gaschromatographische Trennung der Silyläther erfolgte an UCCW 982.

Die Identifizierung der Galakturonsäure erfolgte mit authentischer Substanz. Wie aus Tab. 18 und Abb. 19, S. 78, hervorgeht, läßt sich die Uronsäure gut von den Substanzen (Fructose, Glucosamin, Galaktose, Glucose, Mannose, Glucuronsäure und Inosit) mit ähnlichen Retentionszeiten abtrennen. Eine Verwechslung mit der Glucuronsäure ist, wie die unterschiedlichen Retentionszeiten zeigen, ausgeschlossen.

Nur im Schleim aus Samen Lini konnten wir Galakturonsäure finden. In allen übrigen Schleimen war gaschromatographisch keine Galakturonsäure nachzuweisen, auch nicht bei geänderten Hydrolysebedingungen.

T a b e l l e 18

Gesamtretentionszeiten und relative Retentionszeiten persilylierter Zucker und Uronsäuren

Zucker	Gesamt-Retentionszeit (Minuten)	Relative Retentionszeit *)
Fructose	20.8	1.11
Glucosamin	21.8	1.06
Galaktose	21.8	1.06
Glucose	23.2	1.00
Mannose	23.8	0.97
Galakturonsäure	25.8	0.89
Glucuronsäure	28.5	0.81
Inosit	36.0	0.64

*) Glucose = 1.00

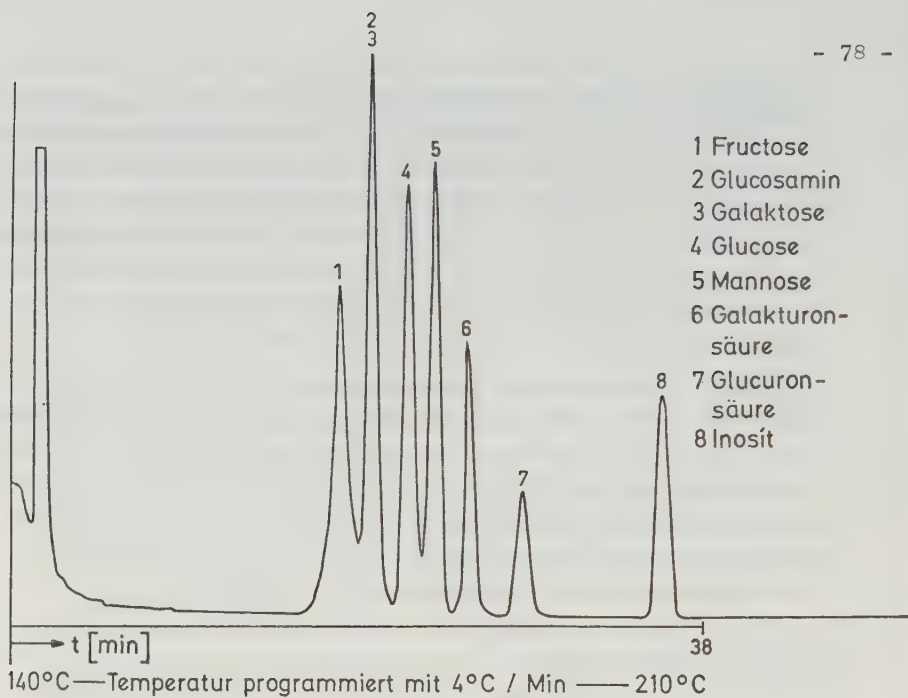


Abb. 19.

Gaschromatographie der silylierten Zucker, Uronsäuren und Inosit-
 UCCW 982, 10% auf Chromosorb W AW DMCS 80-100 mesh

Zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung der Galakturonsäure im Schleim von Samen Lini wurde eine Eichgerade nach der Methode des externen Standards aufgestellt. Dazu wurden ca. 2.0 mg Galakturonsäure in 0.50 ml TMSi-S-Universalreagens gelöst und nach einer Stunde im Gaschromatographen analysiert. Die Eichgerade ist in Abb. 20 wiedergegeben. Sie ist im Bereich von 6.4 μg bis 27.4 μg linear.

Für die quantitative Bestimmung der Galakturonsäure im Schleim wurde eine genau gewogene Menge (ca. 20 mg) nach der oben angegebenen Methode hydrolysiert und in 0.40 ml des Silylierungsreagens gelöst. Durch das Einspritzen genau abgemessener Volumina wurde über die Eichgerade der Gehalt bestimmt.

Im Schleim aus Samen Lini konnten wir Galakturonsäure in der Konzentration von 6.1% ermitteln.

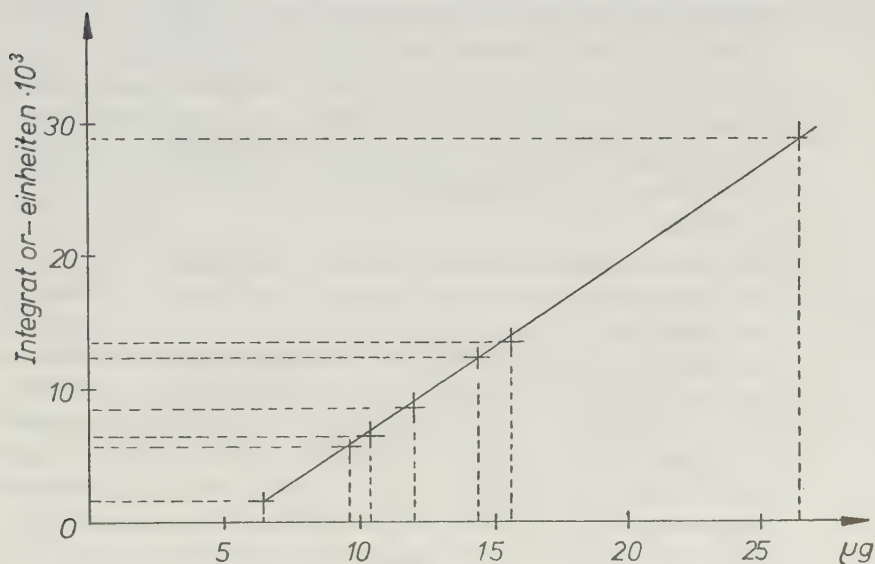


Abb. 20

Eichgerade der Galakturonsäure

9. Versuche zur Charakterisierung von Schleimen mit Hilfe spektroskopischer Verfahren

9.1 Protonen-Resonanz-Spektroskopie

Untersuchungen an Oligosacchariden und anderen niedermolekularen Zuckerderivaten mittels der Protonen-Resonanz-Spektroskopie haben gezeigt, daß diese Methode nicht nur die Identifizierung der Monomerbausteine, sondern auch die Art der glykosidischen Bindung, die Konfiguration und Konformation der Zucker aufzuklären erlaubt (225-228).

Erste Versuche, dieses Verfahren auch auf die Strukturaufklärung von definierten Homopolysacchariden zu übertragen, wurden im Arbeitskreis von HUSEMANN (229) unternommen. Untersucht wurden die Polysaccharide Amylose, Cellulose, Laminaran, Mannan, Dextran u.a. Zur Messung wurden Methyl-, Benzyl-, Acetyl- und Benzoyl-Derivate hergestellt und die Spektren selbst bei einer Frequenz von 220 MHz aufgenommen.

Bei der Derivatisierung zeigte sich, daß sich von Polysacchariden mit β -1-4 verknüpften Zuckern (z.B. Cellulose oder Mannane) Derivate sehr viel schwieriger herstellen ließen, als von den übrigen Bindungstypen (z.B. Amylose(α -1-4) oder Laminaran (β -1-3)).

Bei der Interpretation der Spektren stellte sich heraus, daß die Protonen-Resonanz-Spektroskopie die bisherigen Methoden der Strukturaufklärung in einigen Punkten an Genauigkeit und Einfachheit übertraf. Nach den herkömmlichen Verfahren war zur Identifizierung der verschiedenen Zuckerbausteine der Abbau der Polysaccharide notwendig. Durch Integrierung der einzelnen Signalgruppen gelingt dies bei der PR-Spektroskopie bereits mit den derivatisierten Polymerprodukten. Es konnte zwischen Polysacchariden aus Pentosen (z.B. Xylane) und Hexosen (z.B. Glucane, Mannane) unterschieden werden. Über die Größe der Kopplungskonstanten und ihre Abhängigkeit vom Torsionswinkel ließ sich die Konfiguration der Monomereinheiten, d.h. ob die Pyranose- oder Furanoseform vorlag, bestimmen.

Im Gegensatz zur Konfiguration ändert sich bei Anwendung der bisherigen Methoden die Konformation der Monomere beim Abbau der Polysaccharide. Es konnte also kein Rückschluß auf die eigentliche Konformation im genuinen Polysaccharid gezogen werden. Dies kann bei der PR-Spektroskopie über die auftretenden Kopplungskonstanten ermittelt werden. Es wurde gefunden, daß die Ester von Amylose, Dextran, Laminaran, Cellulose, Xylan und Mannan in C_1 -Sesselform vorliegen.

Die Art der glykosidischen Bindung und die Position der Verknüpfung ließen sich über die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstante des anomeren Protonen-Signals bestimmen. Mit Hilfe der chemischen Verschiebung der H(1)-Signale der Polysaccharidäther war es auch möglich, das Vorliegen mehrerer Bindungstypen nebeneinander anzugeben.

Man konnte allerdings nicht feststellen, ob diese Bindungen zu einem einheitlichen Polysaccharid oder zu einer Mischung gehören. Auch war nicht anzugeben, ob sie von verzweigten (z.B. Glykogen) oder linear aufgebauten (z.B. Pullulan) Molekülen herrührten.

Durch die Untersuchung der Spektren partiell deuteriert substituierter Derivate bestimmten die Autoren außerdem die Stellung der Substituenten im Molekül. Geschah dies in Abhängigkeit von der Umsetzungsdauer, so konnte zusätzlich die Reaktivität der einzelnen Hydroxyl-Gruppen bestimmt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse schien es von Interesse, ob und inwieweit PR-spektroskopische Methoden auch einen Beitrag zur Strukturaufklärung von Schleimderivaten liefern können. In Analogie zu den Arbeiten von HUSEMANN und FRANK (230) haben wir daher versucht, die Schleime von Semen Lini, Folia Malvae und Semen Foenugraeci zu derivatisieren.

(1) Acetylierung

Die Polysaccharidgemische wurden in Formamid bzw. Dimethylformamid suspendiert und anschließend mit Pyridin und Acetanhydrid acetyliert. Die Polysaccharide lösten sich zum Teil in dem Acetyliergemisch. Da die IR-Spektroskopie und die Dünnschichtchromatographie bestätigte, daß

nur eine unvollständige Acetylierung erfolgt war und da auch eine Nachacetylierung keine Verbesserung brachte, mußte dieser Derivatisierungsversuch aufgegeben werden.

(2) Benzoylierung

Die Benzoylierung wurde nach einer Methode von KEILICH und BITTINGER (231) durchgeführt. Hierzu versuchten wir, die Polysaccharide zuerst in Pyridin und dann in einem Pyridin/Dimethylformamid-Gemisch zu lösen bzw. zu suspendieren. Doch die beabsichtigte Benzoylierung gelang nicht, was wahrscheinlich an der ungenügenden Löslichkeit der Schleime lag. Auch nach 24stündiger und erneuter Benzoylierung konnten wir mit Hilfe der IR-Spektroskopie nur eine unvollständige Benzoylierung feststellen.

(3) Benzylisierung

In Anlehnung an die Permethylierung, die von KEILICH et al. (230) nach der Methode von HAKOMORI (168) modifiziert worden war, haben wir auch versucht, diese Derivate herzustellen. Wir ließen das aus Natriumhydrid und Methylsulfoxid entstandene Methylsulfinylcarbanion auf das in DMSO gequollene Polysaccharid einwirken. Das sich bildende Gel verflüssigte sich durch kräftiges Rühren zu einer gelben viskosen Lösung. Danach wurde das Benzylchlorid zugetropft, wobei kurzzeitig eine tiefrote Färbung entstand. Nach Abschluß der Reaktion wurde die Lösung gegen Wasser dialysiert und anschließend säulenchromatographisch vom überschüssigen Benzylchlorid und von den Nebenprodukten abgetrennt. Das gelbliche, etwas klebrige Benzylpolysaccharid wurde durch IR-Spektroskopie auf vollständige Benzylisierung geprüft. Die aufgenommenen Protonen-Resonanz-Spektren waren aber wegen Überlagerung der Ring- und Substituentenprotonen so unübersichtlich, daß eine Interpretation nicht möglich war. Die Chance, durch Vergleich mehrerer "Schleim-Spektren" eine gewisse Gruppeneinteilung zu erreichen, war gering. Offenbar eignen sich zur NMR-Spektroskopie vorerst nur Derivate definierter Polysaccharide. Unsere Drogenschleime sind aber, wie die DEAE-Chromatographie und Disk-

Elektrophorese gezeigt haben, sehr komplexe Gemische, deren einzelne Polysaccharid-Typen zusätzlich sehr voneinander differierende Molekulargewichte besitzen.

9.2 Massenspektrometrie

Die herkömmliche Massenspektrometrie ist zur Strukturaufklärung höhermolekularer Verbindungen (Polymerstoffe oder biologisches Material) nicht geeignet. Daher wurden in den letzten Jahren die Feldionisations- und Felddesorptions-Massenspektrometrie entwickelt.

(1) Feldionisations-Massenspektrometrie (FI-MS)

Bei der Feldionisation (233,234) werden Molekülen durch sehr hohe elektrische Felder Elektronen entrissen. Die benötigten 10^7 V cm^{-1} erzielt man durch inhomogene Felder an scharfen Spitzen, Schneiden oder sehr dünnen Drähten. Das Verfahren arbeitet sehr schonend, so daß nur wenige Fragmentionen und intensive Molekülionen gebildet werden.

Die FI-MS ist die massenspektrometrische Methode, die bei zerfallskinetischen Untersuchungen innerhalb eines großen Zeitbereichs die kürzesten Zerfallszeiten erfaßt. Der zweite Schwerpunkt der Anwendung liegt in der Analyse von Gemischen gasförmiger oder verdampfbarer Verbindungen. Wegen der sehr geringen Fragmentierung, die bei Feldionisation vieler Verbindungen zu beobachten ist, bestehen die FI-Spektren aus charakteristischeren Bruchstücken, die die Interpretation erleichtern. Das Verfahren wurde zur Charakterisierung von Zuckern verwendet (235). Nachteilig bei dieser Methode ist die relativ geringe Empfindlichkeit, die nicht ganz einfache Handhabung und die häufigen Ion-Molekül-Reaktionen.

(2) Felddesorptions-Massenspektrometrie (FD-MS)

Eine Verbesserung gelang 1969 BECKEY (226) durch den Ausbau der FI-Methode zur FD-Methode. Bei der Felddesorption werden die Ionen ebenfalls in einem Bereich sehr hoher Feldstärke erzeugt. Die Probe wird aber nicht - wie bei der Feldionisation - über die Gasphase in die Ionisierungs-

zone zugeführt, sondern sie wird zunächst auf der Emitteroberfläche (Anode) adsorbiert und unmittelbar danach ionisiert. Bei der FD-MS entfällt demnach ein separater Verdampfungsprozeß der Probe, wodurch ein thermischer Zerfall vor der Ionisierung weitgehend eingeschränkt wird.

Wegen der schonenden Ionisation direkt aus der festen Phase ist die Felddesorptions-Technik besonders zur Analyse schwer flüchtiger oder thermisch labiler Substanzen geeignet.

Die Anwendung der FD-Massenspektroskopie im biochemischen Bereich hat sich in den letzten Jahren rasch verbreitet. Die erste mit dieser Technik gemessene Substanz war das Monosaccharid D-Glucose (237). Über das FD-Spektrum des Disaccharids Cellobiose berichteten KRONE und BECKEY (238). RINCHART et al. (239) nahmen die FD-Spektren einer Reihe von Antibiotica auf. Außerdem gibt es bereits entsprechende Untersuchungen an Glykosiden (240), Glucuroniden (241), Nukleosiden und Nukleotiden (242). Eine der neuesten Anwendungen ist die Untersuchung von Pyrolyseprodukten hochmolekularer Substanzen. Bei der Pyrolyse - dem definierten und reproduzierbaren Abbau - von Polymeren entstehen sehr komplexe Gasgemische, die massenspektroskopisch analysiert werden können. SCHULTEN et al. haben mit dieser Methode Nucleinsäure und Desoxynucleinsäure (243), Bakterienstämme (244) und Polysaccharide, wie z.B. verschiedene Dextrane und Glykogen (245), untersucht. Ein Ziel solcher Untersuchungen war es, "Fingerprintspektren" zur Erkennung der hochmolekularen Verbindungen zu erhalten. Diese Ergebnisse haben uns veranlaßt, Schleimgemische mit dieser Technik zu untersuchen. Es sollte ermittelt werden, ob Aussagen über Struktur und Molekulargewichte gemacht werden können. Wir haben Spektren der Schleime von Samen Lini (aus Holland und Belgien) und Folia Malvae (aus Holland und Bulgarien) von MEUZELAAR (FOM-Institut Amsterdam) aufnehmen lassen. Diese Spektren sind mit Curiepunktpyrolyзатор/Quadrupol-Massenspektrometer (Elektronenstoß)/ und Time-averaging Computer angefertigt worden. Die Spektren sind in Abb. 21, 22, 23, 24, Seite 85 u. 86, wiedergegeben.

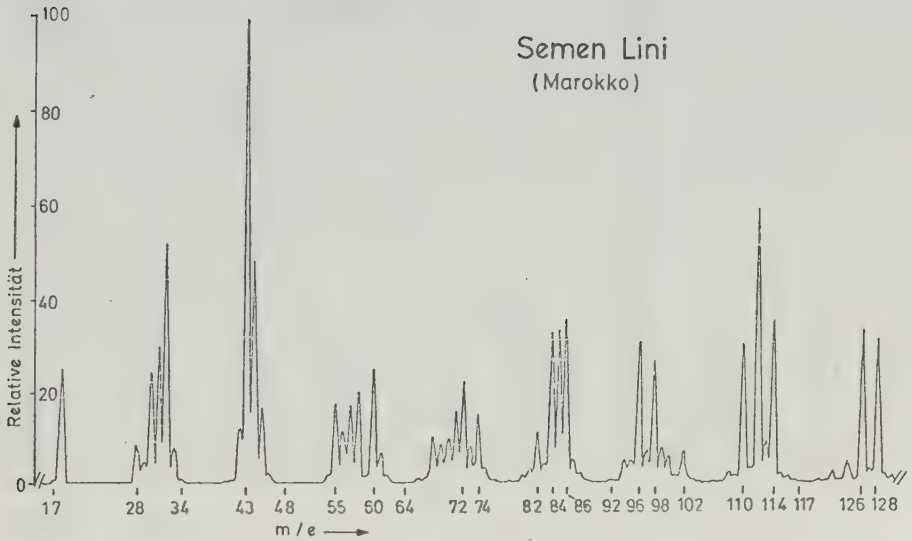


Abb. 21

Pyrolyse-Massenspektrum des Schleimes aus Semen Lini (Marokko)

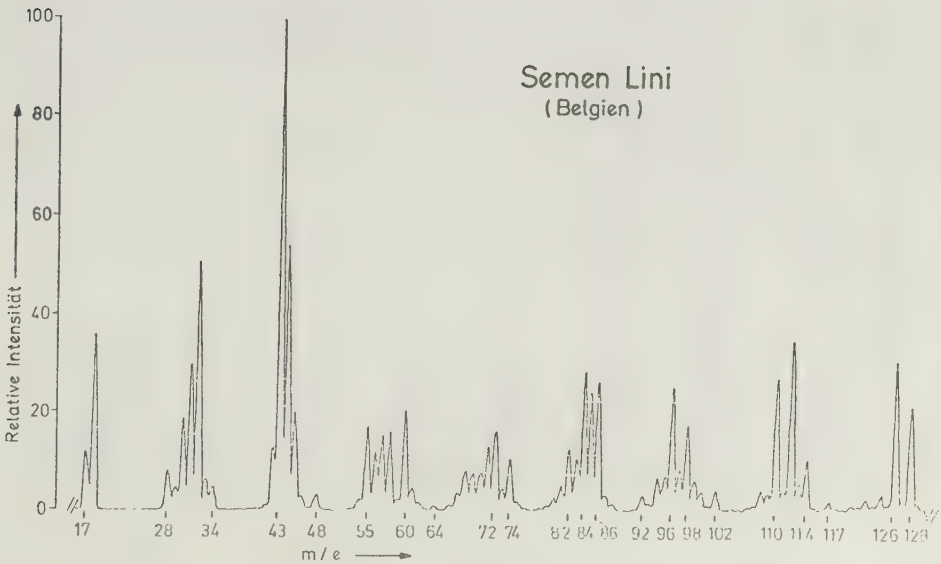
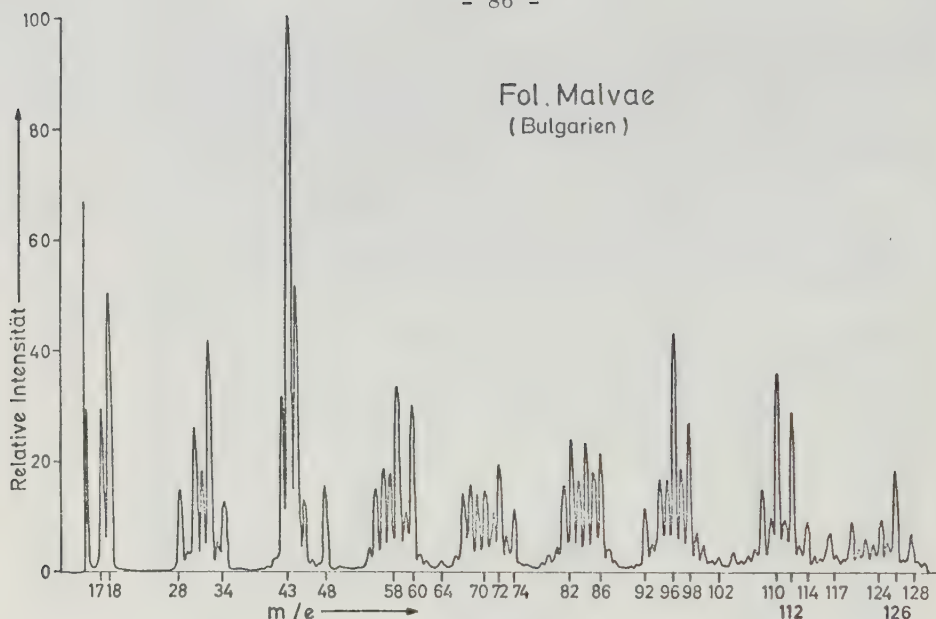
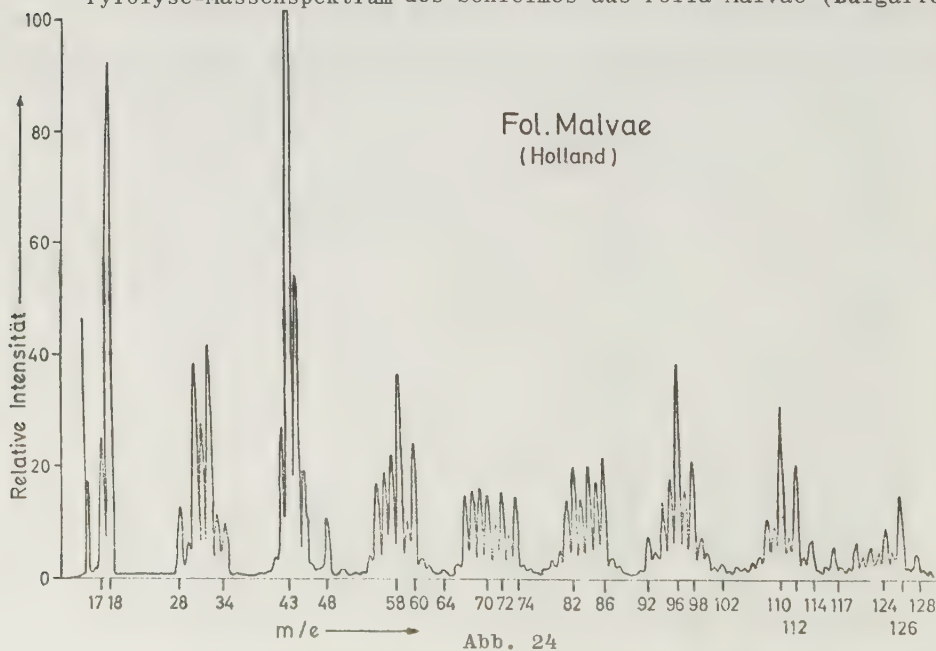


Abb. 22

Pyrolyse-Massenspektrum des Schleimes aus Semen Lini (Belgien)



Pyrolyse-Massenspektrum des Schleimes aus Folia Malvae (Bulgarien)



Pyrolyse-Massenspektrum des Schleimes aus Folia Malvae (Holland)

Hierzu wurde eine Probenmenge im Microgramm-Bereich mit Curiepunktpyrolyse bei 560°C eine Sekunde lang abgebaut. Die entstandenen Pyrolysate diffundieren in die Ionenquelle eines Quadrupol-Massenspektrometers und werden dort mit dem Verfahren der Elektronenstoß-Ionisation ionisiert. Um möglichst große Ausbeuten Molekülionen zu erhalten, wurden zur Ionisierung Elektronen niedriger Energie (etwa 15 eV Energie) verwendet. Der registrierte Massenbereich lag zwischen m/e 17 und m/e 130. Diese Massenskalen sind in den Spektren weiter unten angegeben, und zwar für die wichtigsten Signale. Die Skalen sind linear, so daß Zwischenmassen abgelesen werden können. Die Sequenz der Signale ergab einen exzellent reproduzierbaren "fingerprint" der Substanzen. Die Schleime von Samen Lini aus Marokko und Belgien ergaben außerordentlich ähnliche Spektren. Es werden jedoch kleinere Unterschiede beobachtet, die möglicherweise auf Verunreinigungen zurückzuführen sind. Dies zeigen die Signale m/e 17,34,48,64,92 und 117. Besonders das Signal bei 84 ist unterscheidbar. Die Spektren der Schleime von Folia Malvae aus Bulgarien und Holland sind ebenfalls sehr ähnlich. Kleinere Differenzen sind in den Signalen m/e 33,34,57,72,86 und 95 zu sehen. Hieraus kann gefolgert werden, daß Schleime aus Drogen verschiedener Herkunft den gleichen Aufbau haben. Bedingt durch fehlende Analogie ist es aber noch nicht möglich, genauere Angaben zu machen. Beim Vergleich der Polysaccharid-Pyrolyse-Spektren der Schleime von Samen Lini und Folia Malvae traten erhebliche Intensitätsunterschiede in den einzelnen Signalen auf. Besonders die Signale m/e 30,42,55,58,59,68,70,82,83,108, 110,112 und vor allem 126 und 128 machen dies deutlich.

Es ist daher wahrscheinlich, daß die Curiepunktpyrolyse mit Quadrupol-Massenspektrometer zur Charakterisierung und Unterscheidung von Schleimen herangezogen werden kann. Eine Strukturaufklärung ist jedoch nicht möglich, da nur wenige Signale registriert wurden. Deshalb wurden von SCHULTEN (Universität Bonn) hochaufgelöste komplementäre Curiepunkt-Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektren aufgenommen. Die Auswertungen und die zuverlässige Deutung dieser außerordentlich komplizierten

Spektren waren bis zum Abschluß dieser Arbeit noch nicht beendet. Außerdem soll der Versuch unternommen werden, diese Proben mit Curiepunkt-Pyrolyse-Felddesorptions-Massenspektrometrie zu untersuchen.

10. Zusammenfassung der Ergebnisse und Vorschlag für einen Analysengang von Schleimen

Es wurden neue Methoden zur Identifizierung und Wertbestimmung offizineller Schleimdrogen ausgearbeitet, die sich als Routinemethoden zur Qualitätsbeurteilung von Schleimen eignen. Diese Methoden sind nur anwendbar, wenn es sich um einzelne Schleime, nicht dagegen, wenn es sich um Schleimgemische handelt.

- (1) Die erste Grobeinteilung und Differenzierung ist durch den sog. Alizarin-Schnelltest möglich. Man kann hiermit die Gruppe der Semenschleime, die sich nur schwach anfärben lassen, von der Gruppe der Folia-, Fructus-, Flores- und Radix-Schleime, die sich dagegen intensiv anfärben lassen, unterscheiden.
- (2) Mit Hilfe der erstmals für diese Polysaccharide entwickelten Dünnschicht-Gelchromatographie lassen sich die Schleime aus Folia-, Fructus- und Flores-Drogen mit ihren höheren R_F -Werten (> 0.91) von den Schleimen aus Radix- und Samen-Drogen mit niedrigeren R_F -Werten (< 0.88) unterscheiden.
- (3) Eine der besten Methoden stellt die Disk-Elektrophorese dar. Sie erlaubt eine Differenzierung der Schleime aus Folia und Flores Malvae, Samen Psyllii, Radix Althaeae, Samen Foenugraeci und Fructus Ceratoniae.
- (4) Fraktioniert man die Schleimstoffe über DEAE-Cellulose und benutzt für die Detektion ein Differentialrefraktometer, das an einen Schreiber gekoppelt ist, so erhält man für jeden Schleim ein charakteristisches Kurvenbild. Ein mögliches Kriterium für jeden Schleim sind der Asche- und der Calciumgehalt.

- (5) Durch die Ausarbeitung einer für alle Schleime geeigneten Hydrolysemethode konnte eine vergleichende Zuckerbausteinanalyse durchgeführt werden.

Die qualitative Analyse erfolgte papier-, dünnschicht- und gaschromatographisch. Nachgewiesen wurden Rhamnose, Fucose, Xylose, Arabinose, Mannose, Glucose, Galaktose, Inosit und Galakturonsäure. In jedem Schleim sind mindestens 4 verschiedene Zucker gefunden worden.

- (6) Auf Grund der qualitativen Zuckerzusammensetzung konnten sehr gut die Schleimhydrolysate von Radix Althaeae, Semen Lini, Semen Cydoniae, Semen Psyllii und Semen Foenugraeci unterschieden werden. Die Schleime aus Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Folia und Flores Malvae und Fructus Ceratoniae ergaben das gleiche "Zuckerspektrum".

Die quantitative Zuckerzusammensetzung, die erstmals gaschromatographisch mit silylierten Zuckern über eine Dünnschicht-Glaskapillare, die mit Silikonöl SF 96 beschichtet war, durchgeführt wurde, ergab für die Schleime aus Folia Farfarae, Folia Plantaginis, Radix Althaeae, Semen Lini, Semen Cydoniae, Semen Psyllii und Semen Foenugraeci deutliche Unterschiede.

Die qualitativ nicht zu unterscheidenden Schleime aus Folia und Flores Malvae und Fructus Ceratoniae sind in ihrer quantitativen Zusammensetzung sehr ähnlich.

- (7) Vergleichende Schleimanalysen von Drogen verschiedener Herkunft zeigten, daß die qualitativen und quantitativen Zusammensetzungen nur geringen Schwankungen unterworfen sind.
- (8) Eine Molekulargewichtsbestimmung der Schleimstoffe mit Hilfe von Ultrazentrifugation, Dünnschicht- und Säulenchromatographie und Disk-Elektrophorese ist, da geeignete Eichsubstanzen und eine genaue Kenntnis der Makromolekülstruktur fehlen, nicht möglich.
- (9) Eine schnelle, exakt reproduzierbare Analyse der Schleime, die "fingerprint"-Spektren liefert, erhält man durch Kom-

bination von Curiepunkt-Pyrolysator, Quadrupol-Massenspektrometer und Datensystem. Wir stellten fest, daß die Spektren der Schleime von Samen Lini aus Marokko und Belgien ähnlich sind. Fast identisch sind die Spektren der Schleime von Folia Malvae aus Bulgarien und Holland. Die Pyrolyse-Spektren der Polysaccharide von Samen Lini und Folia Malvae differieren dagegen merklich in ihren Signalintensitäten und können somit gut unterschieden werden. Es hat den Anschein, daß diese neue, noch im Anfangsstadium befindliche massenspektroskopische Methode ausgezeichnet geeignet ist, Schleimstoffe zu charakterisieren und zu unterscheiden.

EXPERIMENTELLER TEIL

11. Herkunft der Drogen

Folgende Drogen wurden in den Jahren 1972 - 1976 von den Firmen Petereit (Elmshorn), Loibl (München), Krämer (Schwebheim), Müggenburg (Hamburg) und Caesar u. Loretz (Hilden) bezogen:

Radix Althaeae

Folia Farfarae

Folia Plantaginis lanceolatae

Folia Malvae (mit Angabe der Anbauggebiete: Ungarn, Jugoslawien, Holland, Bulgarien)

Flores Malvae

Fructus Ceratoniae

Semen Lini (mit Angabe der Anbauggebiete: Belgien, Marokko)

Semen Psyllii

Semen Cydoniae

Semen Foenugraeci

12. Allgemeine Arbeitsmethoden

12.1 Papierchromatographie für Zucker

Die Zucker entwickelten wir aufsteigend, absteigend und 2-dimensional auf 2043 b Mgl-Papier (Schleicher u. Schüll).
Temperatur: 20 - 22°C

Laufzeit aufsteigend: 12 Stdn. über eine Strecke von 35 cm

Laufzeit absteigend: 24 - 36 Stdn. oder 2 - 3mal hintereinander je 12 Stdn.

Laufmittel:

1 - dimensional

n-Propanol-Äthylacetat-Wasser (7:1:2)

n-Butanol-Pyridin-Wasser (7:4:3)

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5 Oberphase)

2 - dimensional

1. Laufrichtung: n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:2)

2. Laufrichtung: Phenol-Wasser (3:1 v/v)

12.2 Dünnschichtchromatographie

Adsorbentien

Zucker:

Kieselgel

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (Merck Art. 5715)
16 g Kieselgel G (Merck Art. 7731) oder Kieselgel HR
(Merck Art. 7744) wurden mit einem der folgenden Puffer
angeschlämmt und auf 3 Glasplatten 20 x 20 cm ausge-
strichen:

0.02 M-Borsäure (246,247)

0.1 M-Natriumbisulfit (248)

Kieselgur

16 g Kieselgur G (Merck Art. 8129) wurden angeschlämmt
mit:

0.02 M-Natriumacetat (249)

0.1 M-Natriumhydrogenphosphat (250)

Polyamid

10 g Polyamid 6D (Riedel-de-Häen Art. 33 590) wurden
mit Benzol angeschlämmt.

Cellulose

DC-Alufolien Cellulose (Merck Art. 5552)

DC-Fertigplatten Cellulose (Merck Art. 5716)

Polysaccharide:

Sephadex

5 g Sephadex G-200 Superfine (Pharmacia Uppsala Art.-
Nr. 2171) wurden mit 500 ml Wasser aufgeschlämmt und
3 Tage bei Raumtemperatur oder 5 Stdn. im Wasserbad
(100°C) stehen gelassen. Der Überstand wird abgegossen
und ein Teil des Gels über einem Faltenfilter soweit
von Flüssigkeit entfernt, bis ein wenig fließbarer
Brei zurückbleibt. Bei vorsichtigem Abdekantieren der
dünnen Suspension kann auf Filtration verzichtet wer-
den. Mit einem großen Spatel wird eine Probe entnommen
und auf einer Glasplatte 20 x 20 cm aufgetragen. Läuft
das Gel beim Schräghalten der Platte herunter, so muß
länger filtriert bzw. von der dünnen Suspension abde-

kantiert werden. In dem Augenblick, wo das Gel auf der Platte haftet, wird in das auf einer Glasplatte liegende Streichgerät (Fa.Boehringer) mit 0.5 mm Schichtdicke überführt und beschichtet. Mit 5 g trockenem Sephadex können drei Platten beschichtet werden. Die Gelplatten lassen sich sofort verwenden oder 2 bis 3 Tage in einer feuchten Kammer aufbewahren.

Polysaccharidderivate:

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (Merck Art. 5715)

Laufmittel

Zucker: 1-dimensional

Äthylacetat-Pyridin-Wasser (2:1:2 Oberphase)

Methyläthylketon-Essigsäure-Methanol (6:2:2)

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5 Oberphase)

Phenol gesättigt mit Wasser und Ammoniak 1%

Äthylacetat-Pyridin-Wasser (8:2:1)

Isopropanol-konz.Ammoniak-Wasser (5:4:1)

Butanol-Äthanol-Ammoniak-Wasser (40:10:1:19)

Isopropanol-Pyridin-Wasser (6:2:2)

Isopropanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (8:8:1:4)

2-dimensional

1.Laufrichtung: Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:37)

2.Laufrichtung: wassergesättigtes Phenol (251)

Inosit:

Eisessig-Aceton-Methanol-Benzol (5:5:20:70)

Chloroform-Methanol-Wasser (32:25:5)

Polysaccharide:

Wasser

Acetylierte Polysaccharide:

Chloroform-Methanol (9:1)

Benzylierte Polysaccharide:

Äther-Methanol-Wasser (100:16.5:13.5)

Methylierte Polysaccharide:

Benzol-Aceton (2:1)

Anfärbereagenzien

Zucker:

Anilinphthalat-Lösung (184,185)
p-Anisidinphthalat-Lösung (186)
Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz (187)
Thymol-Schwefelsäure-Reagenz (188)
Ammoniakalische Silbernitrat-Lösung (252)
Trevelyan-Reagenz (253)
Anthrone-Reagenz (254)
Natriummetaperjodat-4-Nitranilin-Reagenz (255)
Nachbehandlung: 10 Min. bei 110°C erhitzen.

Uronsäure:

Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagenz (256)
Nachbehandlung: 5-10 Min. auf 105°C erhitzen.
Naphthoresorcin-Trichloressigsäure-Reagenz (257)
Nachbehandlung: 10-15 Min. in feuchter Atmosphäre
(Wasserbad) auf 70-80°C erwärmen.

Inosit:

Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagenz (258)
Nachbehandlung: 2 Min. mit Infrarotlampe im Abstand
von 30 cm bestrahlen und dann 7 Min. langwelligem
Licht aussetzen bzw. 5-10 Min. auf 110°C erhitzen.

Polysaccharide:

0.01%ige wässrige Alizarin-Natriumsulfonat-Lösung
(Merck Art. 6279) für Papierabklatsch (Schleicher u.
Schüll 2043 b)
Nachbehandlung: Lufttrocknung des Papiers.

Polysaccharidderivate:

Äthanolische Schwefelsäure (50%)-Reagenz
Nachbehandlung: 5-10 Min. auf 110°C erhitzen.

12.3 Säulenchromatographie

Ionenaustauscherchromatographie zur Schleimfraktionierung

Säulengröße: Ø 1.8 cm, Höhe 30 cm

Adsorbens: DEAE-Cellulose (Servacel, Serva Art. 450 50)

Etwa 10.0 g DEAE-Cellulose wurden zweimal nacheinander in 0.5 N-HCl, Wasser, 0.5 N-NaOH, Wasser aufgeschlämmt. Die überstehenden Lösungen wurden jeweils verworfen. Dann wurde unter Rühren 500 ml 0.25 M-Ammoniumcarbonatpufferlösung hinzugegeben und 45 Min. stehengelassen. Die trübe überstehende Lösung wurde verworfen und der Austauscher in das Chromatographierohr eingeschlämmt.

Gelchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung der Schleime

Adsorbentien:

Bio-Gel A-0.5 m 100-200 mesh (operating range 10 000 - 500 000 mol.wt.) (BIO RAD Laboratories Art. 1510140)

Bio-Gel A-50 m 100-200 mesh (operating range 100 000 - 50 000 000 mol.wt.) (BIO RAD Laboratories Art. 1511340)

Sephacrose CL-6B (fractionation range 100 000 - 1 000 000 mol.wt.) (Pharmacia Fine Chemicals).

Kieselgelsäulen zur Reinigung der benzylierten Polysaccharide

Verwendet wurde Kieselgel Merck 60 (0.05-0.2 mm), das mit dem Elutionsmittel Äthylacetat-Toluol (1:1) in die Säule eingeschlämmt wurde.

Disk-Elektrophorese zur Schleimfraktionierung

Geräte: Shandon Analytisches Acrylamid-Säulenelektrophoresegerät, Shandon Netzgerät SAE 27-61

Kammerpuffer: 7.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0,
0.1% SDS, pro Liter, 1:1 verdünnt

Gelpuffer: wie Kammerpuffer nur unverdünnt

Gelzusammensetzung: 16 ml Gelpuffer, 5 ml Acrylamid (Serva),
151.5 ml Ammoniumpersulfat (Merck),
0.045 ml Tetramethyläthylendiamin (Serva)
pro Liter

Acrylamidstammlösung: 22.2 g Acrylamid

0.6 g Bisacrylamid (Serva)

Aqua dest ad 100.0 ml

Verwendete Gelkonzentration 10%

Gelröhrchen: Ø 6 mm, Höhe 10 cm

Vorlauf: 40 mA, 30 Min.

Laufzeit: 60 mA, 30 Volt, 8 Std.

12.4 Gaschromatographie

(1) Gerät: Perkin Elmer 900

Trägergas: Argon, ca 30 ml/Min.

Detektor: FID

Schreiber: Perkin Elmer S 56, 2.5 mV

Papiervorschub: 5 mm/Min.

Integrator: Perkin Elmer D 26 mit Kienzle Drucker D 21

Integritorempfindlichkeit: 0.5 μ V/Sek.

Zuckeralditolacetate

Säule: Glas, 1.8 m x 2 mm $\emptyset$

ECNSS-M 3% auf Gaschrom Q 100-200 mesh

(Firma Applied Science Laboratories)

Temperaturen: Einlaß- und Detektortemperaturen: je 250°C

Säulenofen: 160-200°C, linear programmiert mit 1.5°C/Min.

Programmbeginn unmittelbar nach dem Einspritzen.

Alditolacetate der partiell methylierten Zucker

Säule: Glas, 1.8 m x 2 mm $\emptyset$

ECNSS-M 3% auf Gaschrom Q 100-200 mesh

Säulenofen: 160-170°C isotherm

Zuckertrimethylsilyläther

Säule: Glas, 3.6 m x 2 mm $\emptyset$

UCCW 982, 10% auf Chromosorb WAWDMCS 80-100 mesh

(Firma Hewlett-Packard, Böblingen)

Temperaturen: Einlaß- und Detektortemperaturen: je 250°C

Säulenofen: 140-210°C, linear programmiert mit 4°C/Min.

Programmbeginn unmittelbar nach dem Einspritzen.

(2) Gerät: Carlo Erba-Kapillarsäulen-Gaschromatographie

Zuckertrimethylsilyläther

Trägergas: Wasserstoff

Detektor: FID

Säule: Glas, 50 m x 0.32 mm $\emptyset$

Silikon SF 96 (Methylsilikonöl General Electric)

Säulenofen: 100-200°C, linear programmiert mit 4°C/Min.

Gasdurchfluß: 2 ml/Min.

Luftdurchfluß: 20 ml/Min.

Papiervorschub: 20 inch/Stde.

12.5 Physikalisch-chemische Untersuchungen

Aschegehalt

(1) der Droge

1.000 g der zerkleinerten Droge wurde in einen vorher bis zur Gewichtskonstanz geglühten Tiegel gebracht und auf dem Tiegelboden gleichmäßig verteilt. Unter allmählicher Steigerung der Temperatur wurde erhitzt, bis der Rückstand kohlenstofffrei war, wobei nicht stärker als bis zur dunklen Rotglut erhitzt werden durfte. Der Rückstand wurde bis zum konstanten Gewicht geglüht. Nach jedem Glühen ließ man im Exsiccator erkalten.

(2) des Schleimes

1.000 g Schleim wurden in einen bis zur Gewichtskonstanz geglühten Tiegel eingewogen. Der Schleim wurde mit einer 10%igen Ammoniumnitratlösung durchgefeuchtet, im Trockenschrank eingedampft (1 Stde. 105°C) und dann wie unter (1) geglüht.

Quellungszahl (DAB 7/BRD)

1.000 g der gepulverten Droge wurden in einem verschließbaren, in 0.2 ml unterteilten 25 ml Meßkolben (Länge der Einteilung von 0 bis 25 ml etwa 130 mm) mit 1.00 ml Äthanol 96% oder Aceton befeuchtet und mit 25.0 ml Wasser versetzt. Die Probe wird innerhalb 1 Stde. in Abständen von jeweils 10 Min. kräftig durchgeschüttelt. Nach weiteren 3 Stdn. wurde das Volumen der abgesetzten Droge einschließlich des anhaftenden Schleims abgelesen.

Die Quellungszahl wurde als Mittelwert aus 3 Parallelversuchen berechnet.

Viskosität

0.100 g gepulverter Schleim wurden mit 2.50 ml Äthanol angerieben und in einem Meßkolben mit Wasser auf 100.0 ml aufgefüllt. Dann wurde die Lösung in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit Normalschliff übergeführt und unter Rückflußkühlung und öfterem Umschwenken 60 Min. im Sieden gehalten. Anschließend wurde schnell auf 20°C abgekühlt und die Flüssigkeit durch eine Glasfilternutsche 17 G 2 gesaugt. Die Viskosität dieses

Auszuges wurde unter Verwendung eines UBBELOHDE-Viskosimeters Größe I bestimmt.

Die Viskosität wurde als Mittelwert aus mindestens 5 Messungen errechnet (s.S. 19).

KPG-UBBELOHDE-Viskosimeter mit hängendem Kugelniveau (Firma Schott) App.Nr. 40 981 (24 501 10)

Konstante K = 0.01027

Dialyse

300.0 ml der Schleimlösung (0.1%) wurde in einen Dialysierschlauch eingefüllt und 4 Tage von fließendem Wasser umspült. Der dialysierte Schleim wurde anschließend auf 1/4 seines Volumens eingeengt und in Äthanol ausgefällt. Dialysierschlauch: Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich, Kontroll-Nr. 1426/2.

UV- und Vis.Messungen

Einzelmessungen der Alizarin-Schleimlösungen (0.2%) wurden an einem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PQM II in einer 1 cm Küvette durchgeführt.

UV-Spektren wurden am Beckman DK 2A ratio-recording Spektralphotometer aufgenommen.

IR-Spektren

Die in KBr eingebetteten Polysaccharidderivate wurden mit dem Beckman IR-8 Spektralphotometer gemessen.

NMR-Spektren

Die Protonen-Resonanz-Spektren wurden in CDCl_3 -Lösung (10%) mit einem Varian-Spektrographen HR 220 am Institut für Biochemie II der Universität Heidelberg aufgenommen.

Farbreaktionen

10 mg Schleim wurden in 4 ml Wasser gelöst und mit 1 ml einer wässrigen Alizarin-Natriumsulfonat-Lösung (0.0125%) versetzt.

Feldemissions- und Spektralanalysen

Calcium-, Magnesium-, Natrium- und Kaliumanalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor Dr. Franz Pascher (Bonn) und von der Bayer.Hauptversuchsanstalt für Landwirtschaft (Technische Universität München) ausgeführt.

13. Durchführung der Untersuchungen

13.1 Isolierung von Rohschleim

Die luftgetrocknete, geschnittene Schleimdroge wurde im Mixer ca. 10 Min. sorgfältig zerkleinert. Vom Drogenpulver wurde mit Wasser eine 5%ige Suspension hergestellt, die während 12 Stdn. unter Rühren bei 20°C extrahiert wurde. Die schleimige Drogensuspension wurde koliert und abgepreßt. Das Extraktionsgut wurde erneut mit der gleichen Menge Wasser suspendiert, nochmals koliert und abgepreßt. Die bei der Drogenextraktion erhaltenen Filtrate wurden vereinigt und zur Entfernung von Ballaststoffen 20 Min. bei 20 000 g zentrifugiert. Auf Abwesenheit von Stärke wurde im mikroskopischen Präparat mit Jodjodkalium-Lösung geprüft. Die Schleimlösung wurde auf ein Viertel des Volumens eingengt, so daß eine Schleimkonzentration von ca. 1% erhalten wurde. Diese Lösung wurde unter Rühren in die vierfache Menge Äthanol (mit 1% Essigsäure) gegossen. Der ausgefallene Rohschleim setzte sich ab. Nach 24 Stdn. wurde die Fällung auf eine Nutsche gebracht und mehrmals mit Äthanol und Äther gewaschen. Die vollständige Trocknung erfolgte über P_2O_5 im Vakuumexsiccator. Anschließend wurde der Schleim gewogen. Die absolute Schleimmenge war immer auf die bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Droge bezogen.

13.2 Ionenaustauscherchromatographie zur Schleimfraktionierung

Säulengröße: Ø 1.8 cm, Höhe 30 cm

Adsorbens: DEAE-Cellulose (Servacel)

Elutionsmittel: 0.25 M-Ammoniumcarbonatpuffer

Druck: 1.5 bis 2 atü

Durchfluß: 1⁰⁰ ml/Stde.

Refraktometer: Lamidur (WINOPAL), RJ x 4

Schreiber: Servocor M

Papiervorschub: 30 mm/Stde.

Substanzmenge: 1.2 ml (Dosierung: Probenschleife) einer
Lösung von 10 mg/ml

Fraktionierung: 5 ml/Fraktion

Der im Elutionsmittel gelöste Schleim wurde über die Probenschleife auf die vorbereitete Säule gebracht und an das Drucksystem angeschlossen. Dieses bestand aus einer Stickstoffbombe und einem Druckbehälter, wie bei GLASL (156) beschrieben. Der Gasvordruck an der Stickstoffflasche wurde durch ein Feinreguliertventil konstant bei 1.5 bis 2 atü gehalten. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde dadurch reguliert, daß der vom Detektor zum Fraktionssammler führende Schlauch mit einer Klemme versehen wurde. Der Detektor war mit einem Schreiber gekoppelt (Bilder siehe Seite 44).

0.5 ml der einzelnen Fraktionen wurden mit 0.5 ml 0.1%iger Carbazollösung und 2 ml konz. Schwefelsäure versetzt, umgeschüttelt und 15 Min. in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion bei 530 nm gegen Schwefelsäure gemessen.

13.3 Disk-Elektrophorese zur Schleimfraktionierung Prüflösungen:

Ca. 0.5 mg Schleim bzw. Dextran (wie unter 13.4 angegeben) wurden in 10 µl Mercaptoäthanol und 100 µl Pufferlösung gelöst.

Das unter Eiskühlung hergestellte Gel (wie unter 12.3 angegeben) wurde in die Gelröhrchen eingefüllt. Nach dem Entgasen wurden auf die Gele 1.5 ml Ammoniumpersulfatlösung (15 mg/ml) und 0.0045 ml Tetramethyldiaminlösung gegeben. Nach 10 bis 20 Min. war das Gel gefestigt.

Die Hälfte der Prüflösung wurde auf die Gele appliziert. Anschließend wurden die Gelröhrchen und die beiden Vorratsgefäße des Elektrophorese-Apparates mit dem Puffer aufgefüllt. Die Elektroden wurden an das Gleichstromnetzgerät angeschlossen und die Elektrophorese bei 60 mA, 30 Volt in 8 Stdn. durchgeführt.

Entfernung der Gele aus den Gelröhrchen:

Damit sich die Substanz-Zonen im Gel nicht durch Diffusion verbreitern, müssen die Gele sogleich aus den Röhrchen entfernt werden. Mit einer 10 ml Spritze mit aufgesetzter Injektionsnadel aus rostfreiem Stahl, die mit Wasser gefüllt

war, wurden die Gele vorsichtig herausgelöst. Hierzu drehte man mit den Fingern der linken Hand die Gelröhrchen kontinuierlich und schob mit der rechten Hand die Injektionsnadel zwischen Röhrcheninnenwand und Gel nach vorne. Dabei diente die ausfließende Spritzenfüllung als Schmiermittel. Die Gele lösten sich langsam ab und wurden vorsichtig in die Reagenzgläser eingefüllt.

Nachweis der getrennten Substanzen-Zonen:

Zu den eisgekühlten Gelen wurden eine eisgekühlte Anthronlösung (0.05%) in 70 Vol% Schwefelsäure gegeben. Die Reagenzgläser wurden 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und danach gekühlt (s.Seite 40).

13.4 Gelchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung der Schleime

Säule: Ø 1.6 cm, Höhe 100.0 cm

Adsorbentien:

- (1) Bio-Gel A-0.5 m (BIO-RAD)
- (2) Bio-Gel A-50 m (BIO-RAD)
- (3) Sepharose CL-6B (Pharmacia)

Die Gelsuspension wurde unter Vermeidung von Luftblasen in einem Guß in die Säule eingebracht. Sobald sich ein ca. 2 cm hoher Bodensatz gebildet hatte, ließ man abtropfen. Unter hydrostatischem Druck wurde die Säule 2 Tage bei 4°C gewaschen, wobei sich die anfängliche Tropfgeschwindigkeit verringerte. Zur Bestimmung des Außenvolumens wurde 0.5 ml Dextranblau 2000 (0.5%) auf die Säule gegeben.

Elutionsmittel: 0.1 M-Ammoniumformiatpuffer

Tropfgeschwindigkeit: 10 Tropfen/Min.

Fraktionierung: 2 ml/Fraktion

Eichsubstanzen: Dextran T 10

Dextran T 20

Dextran T 40

Dextran T 70

Dextran T 110

Dextran T 500 (alle Pharmacia Fine Chemicals)

10 mg Dextran bzw. Schleim wurden in 5 ml Elutionsmittel gelöst und auf die Säule gebracht.

Mit den am automatischen Fraktionssammler aufgefangenen Fraktionen wurde nach Verdünnen mit Wasser der quantitative Kohlenhydratnachweis mit Anthron durchgeführt.

Farbreaktion: Nach Verdünnen der Fraktionen (1:20) wurden 1 ml mit 2 ml 0.2%iger Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure versetzt und 4 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt.

Messung: Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde bei 620 nm im Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II gegen eine Blindlösung gemessen (Ergebnisse s.S. 35).

- 13.5 Dünnschicht-Gelchromatographie zur Schleimunterscheidung
Chromatographische Ausrüstung: DC-Chromatographie Apparat der Firma Boehringer Mannheim GmbH., Mannheim (Abb. 25, S.103). Die mit Sephadex beschichtete Glasplatte (wie unter 12.2 angegeben) wurde in die Trennkammer gelegt. Der Elutionstrog wurde mit Wasser gefüllt. Zwei Papierstreifen 5 x 19 cm (Schleicher u. Schüll 2043 b) wurden kurz eingetaucht und durch Abtropfen von zuviel Elutionspuffer befreit. Ein angefeuchteter Papierstreifen wurde mit einem Längsende in den Trog gebracht und mit dem anderen Ende etwa 1.5 bis 2 cm über den oberen Rand der Gelplatte gelegt und vorsichtig angedrückt. Der zweite Streifen wurde 1.5 bis 2 cm über die untere Plattenkante gelegt und leicht angedrückt.

Über das zu- und ablaufende System wurde die an den Längsseiten mit aufgeschlitzten Schläuchen versehene Deckplatte gelegt.

Bei einer Winkelstellung von 10^0 ließ man die Platten über Nacht äquilibrieren.

Prüflösungen:

0.15%ige in Wasser gelöste Schleime bzw. Dextran-Eichsubstanzen (wie unter 13.4 angegeben).

Auftragen der Prüflösungen:

Die Gelplatte wurde horizontal auf eine Platte oder bei 0° -Winkeleinstellung in das Chromatographiegerät gelegt. Es ist zweckmäßig, das Gel 3 - 4 mm an den Längsseiten mit einem Spatel zu entfernen, um Randeffekte zu vermeiden. 2 - 5 μ l der Prüflösungen wurden vorsichtig und ohne die Gelplatte zu berühren mit einem Schmelzpunktsbestimmungsröhrchen etwa 3 cm vom oberen Plattenrand aufgetragen. Die Startpositionen wurden mit einem Filzschreiber auf der Rückseite der Gelplatte markiert.

Chromatographie:

Die Chromatographie wurde bei einem Neigungswinkel von 30° ausgeführt.

Eluans: destilliertes Wasser

Laufzeit: 5 Std.

Anfärbeverfahren:

Ein mit einer 0.0125%igen Alizarinsulfonat-Lösung getränkter noch feuchter Papierbogen wurde auf die feuchte entwickelte Gelplatte vorsichtig aufgelegt. Nach 2 - 3 Min. wurden die Schleime als rote Flecke auf gelblichem Papier sichtbar. Das Papier wurde von der Gelplatte vorsichtig abgezogen und an der Luft getrocknet (siehe Abb. 7, S. 32).

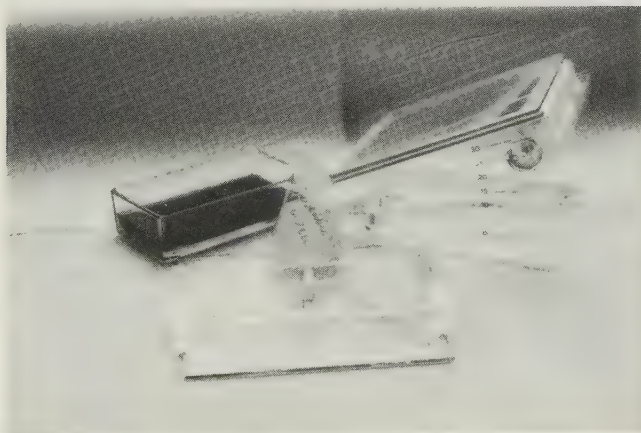


Abb. 25

DC-Gelchromatographie-Apparat

13.6 Hydrolyse der Schleime

(1) Schwefelsaure Hydrolyse

200 mg Rohschleim bzw. je 0.0001 Mol der unter 13.6 (3) angegebenen Testzucker wurden in 20 ml N-Schwefelsäure gelöst und im Autoklav bei 133°C 2 atü 2 Stdn. lang hydrolysiert. Die Lösung wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert und der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene eingengt. Die im Rückstand vorhandenen Zucker wurden entweder papier- und dünn-schichtchromatographisch nach 12.1 und 12.2 untersucht oder zur Gaschromatographie (wie unter 14.1 (1) angegeben) in ihre Alditolacetate übergeführt.

(2) Trifluoressigsäure Hydrolyse

10 mg Rohschleim bzw. je 1 mg der unter 13.6 (3) angegebenen Testzucker wurden in 2 ml 2 N-Trifluoressigsäure gelöst und im Autoklav bei 119°C 1 atü 1 Stde. lang hydrolysiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene eingengt und der Rückstand entweder zur papier- oder dünn-schichtchromatographischen Untersuchung der Zucker (wie unter 12.1 und 12.2 angegeben) oder zur Gaschromatographie (wie unter 14.1 (2) angegeben) in ihre Silyläther übergeführt.

(3) Testsubstanzen:

L-Arabinose, puriss. (Fluka)	D-Glucose, f.bioch.Zw. (Merck)
D-Xylose, f.bioch.Zw. (Merck)	D-Galaktose, f.bioch.Zw. (")
D-Ribose, f.bioch.Zw. (Merck)	D-Mannose, f.bioch.Zw. (Merck)
L-Fucose, reinst (Serva)	D-Glucosamin, f.bioch.Zw. (")
L-Rhamnose, f.bioch.Zw. (Merck)	D-Galakturonsäure, f.bioch. Zw. (Merck)
D-Fructose, f.bioch.Zw. (Merck)	D-Glucuronsäure, rein (Serva)
	Meso-Inosit, puriss. (Fluka)

14. Quantitative Bestimmungen

14.1 Zucker und Uronsäure

14.1.1 Darstellung der Alditolacetate

a. Reduktion mit Natriumborhydrid

Die unter 13.6 (1) erhaltenen Zucker des hydrolysierten Schleims bzw. die Testzucker wurden in ca. 10 ml Wasser gelöst und mit ca. 10 mg Natriumborhydrid bei Raumtemperatur 3 Stdn. stehen gelassen. Dann wurden die Na^+ -Ionen durch spatelweise Zugabe von Dowex 50 (H^+ -Form) und kräftigem Mischen am Whirlimix entfernt. Anschließend wurden die Lösungen filtriert und am Rotationsverdampfer bei 40°C zu Trockene eingengt.

b. Entfernung der Borsäure

Die Probe wurde mit 3 ml Methanol versetzt und der gebildete Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Diesen Vorgang wiederholten wir viermal, um die Borsäure zu entfernen, da die Reste der Borsäure die nachfolgende Acetylierung stören würden.

c. Acetylierung

Zu dem Rückstand pipettierte man 2.0 ml einer Mischung aus Pyridin p.A. und Essigsäureanhydrid p.A.. Das Gemisch wurde 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurden 6 μl des Reaktionsgemisches gaschromatographisch wie unter 12.4 (1) angegeben untersucht.

14.1.2 Darstellung der Trimethylsilyläther

- (1) Die unter 13.6 (2) erhaltenen Zucker des hydrolysierten Schleims bzw. die Testzucker wurden in 1.0 ml Pyridin gelöst und mit 0.25 ml N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) (Firma Serva Art. 15 129) versetzt. Die gut verschlossenen Kölbchen wurden 30 Min. auf 60°C (Wasserbad) erhitzt. Anschließend wurde die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und in 1 ml n-Hexan gelöst. 1 μl des Reaktionsgemisches wurde gaschromatographisch, wie unter 12.4 (2) angegeben, untersucht.

Für die Ausführung der gaschromatographischen Bestimmungen der Zuckertrimethylsilyläther danken wir Frau I. u. Herrn G.Blos.

- (2) Die unter 13.6 (2) erhaltenen Zucker des hydrolysierten Schleims bzw. die Testzucker wurden in genau 0.5 ml TMSi-S-Universalreagens (enthält bistrimethylsilyltrifluoracetamid, trimethylchlorsilan, trimethylsilylimidazol (3:2:3) (Firma Serva Art. 36 559) gelöst. Nach einer Stunde wurde die Lösung gaschromatographisch, wie unter 12.4 (1) angegeben, untersucht.

14.2 Calcium und Magnesium

Reagenzien:

Calconcarbonsäure (Merck)

Spezial-Indikatorpapier pH 9.5 - 13.0 (Merck)

Titriplex III-Lösung 1/100 molar (Merck)

Ammoniaklösung mind. 25% (0.910) z.Anal. (Merck)

Indikator-Puffertabletten (Merck)

Perhydrol (30 Gew.% H_2O_2 = 100 Vol.0) z.Anal.(Merck)

Salzsäure mind. 25% (1.124 - 1.126) z.Anal.(Merck)

Die unter 12.5 erhaltene Asche der Schleime wurde mit 5.0 ml konzentrierte Salzsäure aufgekocht und noch warm in 100.0 ml Meßkolben gegossen, die mit Wasser aufgefüllt wurden. Je 25.0 ml dieser Lösungen wurden zu 100.0 ml mit Wasser verdünnt und Calcium und Magnesium titrimetrisch bestimmt.

Calcium

100.0 ml dieser oben hergestellten Lösungen wurden mit 25%iger Kalilauge versetzt, so daß Magnesium ausfällt und die Lösungen einen pH von 12 besitzen. Nach Zugabe von 5 - 10 Tropfen 0.4%iger wässriger Calconcarbonsäurelösung wurde unter kräftigem Rühren (Elektromagnetrührer) mit 1/100 molarer Titriplex III-Lösung bis zum Farbumschlag von Weinrot nach Reinblau titriert (Feinbürette).

1 ml 1/100 M-Titriplex III-Lösung = 0.4008 mg Ca

Magnesium

Nach Zugabe von etwa 1 ml Perhydrol (zur Zerstörung des Indikatorfarbstoffs) wurde auf dem Dampfbad bis zur Farblosigkeit erhitzt.

Danach wurden die Magnesiumhydroxyd-Niederschläge mit Salz-

säure gerade gelöst und nach Zugabe einer Indikator-Puffer-tablette und 1 - 2 ml Ammoniaklösung mit 1/100 molarer Titriplex III-Lösung bis zum Farbumschlag von Rot nach Grün titriert.

1 ml 1/100 M-Titriplex III-Lösung = 0.2432 mg Mg

15. Darstellung von Polysaccharidderivaten

15.1 Acetylierung

1.0 g Polysaccharid wurde in 20 ml Formamid bzw. Dimethylformamid bei 100°C suspendiert. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml Pyridin hinzugegeben und 20 ml Acetanhydrid während 2 Stdn. unter kräftigem Rühren zugetropft. Nach 3 Stdn. wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren in Eiswasser gegossen und nach einer Stunde das Acetat abgenutscht. Das Produkt wurde dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigplatten im Laufmittel Chloroform-Methanol (9:1) (Anfärbereagenz: Äthanolische Schwefelsäure (50%)) und mit IR-Spektroskopie auf vollständige Umsetzung untersucht.

15.2 Benzoylierung

1.0 g Polysaccharid wurde in 15 ml Dimethylformamid bei 80°C gelöst bzw. gequollen und mit 25 ml Pyridin versetzt. Unter Rühren tropfte man 4.5 ml Benzoylchlorid zu und ließ über Nacht reagieren. Danach wurde das Gemisch in Äther oder Methanol ausgefällt und aus Chloroform/Methanol umgefällt. Der Nachweis erfolgte mit IR-Spektroskopie.

15.3 Benzylierung

a. Darstellung des Methylsulfinylcarbanions

1.0 g NaH (50%ige Dispersion) wurde 3mal mit Petroläther gewaschen, im Vakuum von Petrolätherresten befreit und unter N₂ und Feuchtigkeitsausschluß mit 10 ml Dimethylsulfoxid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren so lange auf 60 - 70°C erwärmt, bis kein H₂ mehr entstand (ca. 1 Stde.).

b. Benzylierung

Zu 10 ml der unter 15.3 a. hergestellten Base wurde bei

25°C unter starkem Rühren eine Suspension von 1.0 g Polysaccharid in wasserfreiem DMSO zugetropft und die gefärbte viskose Lösung noch weitere 30 Min. gerührt. Die Zugabe von 5.5 ml Benzylchlorid erfolgte in Portionen zu 2.2 - 2.2 - 1.1 ml im Abstand von je einer Stunde. Nach 20 Stdn. wurde das Reaktionsgemisch 2 Tage lang gegen fließendes Wasser dialysiert. Dabei fiel das Benzylpolysaccharid teilweise als weiße, etwas klebrige Substanz aus.

Zur Beseitigung der dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen Begleitsubstanzen wurde 5mal mit je 50 ml Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherphasen wurden mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum bei 40°C zu einem Sirup eingeengt. Die vollständige Abtrennung der erneut dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen Nebenprodukte erfolgte über eine Kieselgelsäule. Hierzu wurden 200.0 g Kieselgel mit Äthylacetat-Toluol (1:1) in die Säule eingeschlämmt. Nach Absetzen wurde die Kieselgelschicht mit einem Filtrierpapier abgedeckt und 2.0 g des Benzylproduktes, gelöst in 10.0 ml Elutionsmittel, auf die Säule gegeben. Es wurde mit Äthylacetat-Toluol (1:1) eluiert und Fraktionen zu 10.0 ml aufgefangen. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Benzylätherfraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene eingeengt. Der Nachweis der vollständigen Benzylisierung wurde mit Hilfe der IR-Spektroskopie erbracht.

Dünnschichtchromatographie:

Adsorbens: DC-Fertigplatten Kieselgel (Merck Art.5715)
Laufmittel: Äther-Methanol-Wasser (100:16.5:13.5)
Anfärbereagenz: Äthanolische Schwefelsäure (50%)

Säulenchromatographie:

Säulengröße: Ø 6 cm, Höhe 50 cm
Adsorbens: Kieselgel Merck 60 (0.05 - 0.2 mm)
Elutionsmittel: Äthylacetat-Toluol (1:1)

16. Darstellung der Methylzuckeralditolacetate

a. Darstellung der methylierten Polysaccharide nach KUHN (167)

1.0 g Polysaccharid wurden in 50 ml frisch destilliertem Dimethylformamid suspendiert. Anschließend wurden 2.5 g Silberoxid und 5 ml Methyljodid hinzugegeben. Die Suspension wurde 2 Tage unter Lichtabschluß gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Chloroform und Wasser gewaschen.

b. Permethylierung nach HAKOMORI (168)

1. Darstellung des Methylsulfinylcarbanions:

Aus Natriumhydrid und Dimethylsulfoxid wurde das Methylsulfinylcarbanion, wie unter 15.3 a. angegeben, hergestellt.

2. Methylierung:

Zu 10 ml der unter b. 1. hergestellten Base wurde unter Rühren eine Suspension von 1.0 g Polysaccharid in wasserfreiem DMSO zugetropft und 12 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Die jetzt dünnflüssige Lösung wurde auf 200 ml Eiswasser gegossen und 5mal mit je 50.0 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden mit 50.0 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung(2%) und 3mal mit Wasser gewaschen. Die mit Na_2SO_4 getrocknete Chloroformlösung engten wir im Vakuum bei 40°C ein. Das erhaltene harzartige Permethylierungsprodukt wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigplatten im Laufmittel Benzol-Aceton (2:1) (Anfärbereagenz: Äthanolische Schwefelsäure(50%)) von den Begleitsubstanzen getrennt. Die ausgeschabte Kieselgelzone wurde mit Chloroform eluiert und die Chloroformphase im Vakuum eingeeengt. Mit Hilfe der IR-Spektroskopie wurde auf vollständige Methylierung geprüft.

c. Hydrolyse

Das Methylprodukt wurde, wie unter 13.6 (1) angegeben, in N-Schwefelsäure gelöst und im Autoklav bei 133°C 2 atü 2 Stdn. lang hydrolysiert. Die mit Bariumcarbonat neutralisierte und abzentrifugierte Lösung wurde im Vakuum zur Trockene eingeeengt.

d. Reduktion mit Natriumborhydrid

Die Methylzucker wurden, wie unter 14.1.1 a. angegeben, mit Natriumborhydrid reduziert und die überschüssigen Na^+ -Ionen mit Dowex 50 (H^+ -Form) entfernt. Die neutralisierte Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C in einem Schliffkolben zur Trockene eingeengt.

e. Acetylierung

In den Schliffkolben wurden, wie unter 14.1.1 c. beschrieben, 2.0 ml einer Mischung aus Pyridin p.A. und Essigsäureanhydrid p.A. gegeben und 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Methylzuckeralditolacetate wurden gaschromatographisch, wie unter 12.4 (1) angegeben, untersucht.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) TSCHIRCH A., Handbuch der Pharmakognosie, Verlag v.Chr.H. Tauchnitz Leipzig (1912) S. 264
- 2) TREIBER E., Chemie der Pflanzenzellwand, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1957) S. 253
- 3) ASPINALL G.O., Gums and mucilages in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* Vol. 2 (1969) S. 333
- 4) HIRST E.L.u.JONES J.K.N. in Peach K. und Tracey M.V., *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* Bd. II, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955) S. 275
- 5) HIRST E.L.u.JONES J.K.N. in Ruhland W., *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. VI, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955) S. 275
- 6) PERCIVAL E., in Swain T., *Comparative Phytochemistry*, Academic Press London and New York (1966) S. 139
- 7) ASPINALL G.O., *Polysaccharides*, Pergamon Press Oxford-New York-Toronto-Braunschweig (1970)
- 8) JANECKE H. u. KEHR W., *Pharm.Ztg.* 105, 684 (1960)
- 9) ASPINELL G.O., in *Advances in Carbohydrate Chemistry* 24, 333 (1969)
- 10) JONES J.K.N. u. SMITH F. in *Advances in Carbohydrate Chemistry* 4, 243 (1943)
- 11) FRIEDRICH O., *Arch.Pharm.* 257, 288 (1919)
- 12) FRANZ G., *Planta med.* 14, 90 (1966)
- 13) LUCKNER M., BESSLER O., LUCKNER R. u. SCHRÖDER P., *Arzn. Stand.* 7, 1513 (1966)
- 14) KARAWYA M.S., BALBAA S.J. u. AFIFI M.S.A., *Planta med.* 20, 14 (1971)
- 15) FRANZ G. u. CHLADEK M., *Pharmazie* 28(2), 128 (1973)
- 16) GUARNIERI u.a. *Zbl.Pharm.* 114 (1975) Heft 1
- 17) ANDERSON E. u. FIREMAN M., *J.Biol.Chem.* 109, 437 (1935)
- 18) HIRST E.L., PERCIVAL E.G.V. u. WYLAM C.B., *J.Chem.Soc.* (London) 189 (1954)
- 19) ERSKINE A.J. u. JONES J.K.N., *Can.J.Chem.* 34, 821 (1956)
- 20) HIRST E.L. u. JONES J.K.N., *J.Chem. Soc.* 1278 (1948)
- 21) GRIFFITH C., *Mgf.Chemist* 20, 321 (1949); *Food* 21, 58 (1952)
- 22) LEW B. u. GORTNER R.A., *Arch.Biochem.* 1, 325 (1943)
- 23) WISE L.E. u. APPLING J.W., *Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.* 16, 28 (1944)
- 24) SMITH F., *J.Amer.Chem.Soc.* 70, 3249 (1948)
- 25) KUBAL J.V. u. GRALEN N., *J.Colloid.Sci.* 3, 457 (1948)
- 26) REICH J.S.G. u. MEIER H., *Phytochemistry* 9, 513 (1970)
- 27) STEINEGGER E. u. HÄNSEL R., *Lehrbuch der Pharmakognosie*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1968) S. 97
- 28) RENFREW A.G. u. CRETHER L.T., *J.Biol.Chem.* 97, 503 (1932)
- 29) BAILEY K. u. NORRIS F.W., *Biochem.J.* 26, 1609 (1932)
- 30) MORVAY J. u. SZENDREI K., *Gyógyszerezés* 11(5) 178 (1967, *Chem.Abstr.* 67, 84794 (1967))
- 31) ANDERSON E. u. LOWE H.J., *Biol.Chem.* 169, 289 (1947)
- 32) ERSKINE A.J. u. JONES J.K.N., *Angew.Chem.* 69, 548 (1957)
- 33) EASTERBY R.J. u. JONES J.K.N., *Nature* 165, 614 (1950)
- 34) HUNT K. u. JONES J.K.N., *Can.J. Chem.* 40, 1266 (1962)
- 35) TIPSON R.S., CHRISTMAN C.C. u. LEVENNE P.A., *J.Biol.Chem.* 128, 609 (1939)

- 36) ANDERSON E. u. CROWDER J.A., J.Am.Chem.Soc. 52, 3711 (1930)
- 37) NIEMANN C. u. LINK K.P., J.Biol.Chem. 104, 205 (1934)
- 38) FRANZ G., Planta med. 17, 217 (1969)
- 39) HAAFLAND E., Acta Chem.Scand. 23, 2546 (1969)
- 40) HAAFLAND E., Acta Chem.Scand. 26(6), 2322 (1972)
- 41) MÖLLER K., Pharmakologie, 5.Aufl., Schwabe, Basel-Stuttgart (1966) S. 167
- 42) GENHARDT H., Grundriß der Pharmakologie, Toxikologie und Arzneiverordnungslehre, 12.Aufl., Müller u.Steinicke, München (1944) S. 287
- 43) TEUSCHER E., Pharmakognosie, Teil I, Akademie-Verlag Berlin, Pergamon Press Oxford, Vieweg u. Sohn, Braunschweig (1970) S.55
- 44) LILJESTRAND G., in Poulsson's Lehrbuch der Pharmakologie, 15.Aufl., Hirzel-Verlag, Leipzig (1945) S. 279
- 45) BANZER G., Arzneitherapie des prakt.Arztes, Urban u.Schwarzenberg, München-Berlin (1964) S. 74
- 46) KOSENOW, Dtsch.med.Wschr. 76, 900 (1951)
- 47) FASOLD, Münch.med.Wschr. 94, 1465 (1952)
- 48) WASICKY R., Planta med. 9, 232 (1961)
- 49) BRAUN H., Heilpflanzenlexikon für Ärzte und Apotheker, 2.Aufl., Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart (1974) S. 113
- 50) MÜNZEL K., BÜCHI J. u. SCHULTZ O.-E., Galenisches Praktikum, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart (1959) S. 295
- 51) FIEDLER H.P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Cantor KG., Aulendorf i.Württ. (1971) S. 343
- 52) GSTIRNER F., Einführung in die Arzneibereitung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart, 2.Auflage (1963) S. 343
- 53) BERTHOLD, Parfümerie und Kosmetik 32, 180 (1951)
- 54) SCHWARZ H., Seifen, Fette, Öle, Wachse 8, 201 (1953)
- 55) LINDEMANN G., Riechstoffe, Aromen, Körperpflege 20, 94 (1970)
- 56) HUTCHINS H.H. u. SINGISER R.E., J.Amer.Pharm.Assoc., Pract. Pharm.Ed. 16, 226 (1955), Chem.Abstr. 49, 10582 (1955)
- 57) BECKER C.H., Am.Profess.Pharmacist 20, 939, 987 (1954), Chem.Abstr. 49, 1279 (1955)
- 58) HARRY R.G., "Modern Cosmetology", Chemical Publishing Co., New York, N.Y., (1956) S. 133
- 59) BENNETT H., "The New Cosmetic Formulary", Chemical Publishing Co., New York, N.Y. (1970) S. 20
- 60) PATEL B.B., Drug and Cosmetic Industry, New York, N.Y. 95, 337 (1964), Chem.Abstr. 61, 14473 (1964)
- 61) DE NAVARRE M.G., "The Chemistry and Manufacture of Cosmetics", D.Van Nostrand Co., New York, N.Y. (1941) S. 289
- 62) RICHARDSON K.N., Soap, Perfumery a.Cosmetics 18, 286 (1945)
- 63) SMITH P.I., Am.Perfumer Aromat. 67, No.6, 67 (1956), Chem. Abstr. 50, 11688 (1956)
- 64) MANBY R.S., U.S.Patent 2, 850, 410 (1958), Chem.Abstr. 53, 2657 (1959)
- 65) MANTELL C.L., The watersoluble gums, Reinhold Publishing Corp., New York (1947)
- 66) RICHTER, Dtsch.Lebensm.Rdsch. 45, 13 (1949)
- 67) LÜBKE A., Seife, Fette, Öle, Wachse 11, 230 (1950)
- 68) HADARY G., Food Ind. 15, 76 (1943)

- 69) SCHORMÜLLER J. u. WINTER H., Nahrung 2, 83 (1958)
- 70) HADARY G., Ice cream, Rev. 26, No. 11, 22 (1943)
- 71) MONCRIEF R.W., Food Manufact. 29, 314 (1954)
- 72) NIKKILA O.E., Finn.Patent. 34, 558 (1965), Chem.Abstr. 65, 11250 (1966)
- 73) HERVEY L.R.B., U.S.Patent 3, 102, 838 (1963), Chem.Abstr. 60, 5745 (1964)
- 74) BOLLEY D.H. u. McCORMACK R.H., U.S.Patent 2, 593, 528 (1952), Chem.Abstr. 46, 9333 (1952)
- 75) MASON C.T. u. HALL L.A., Food Ind. 20, 382 (1948)
- 76) BORESCH K., in F.Honcamp's Handbuch der Pflanzenernährung und Düngelehre Bd.I, Springer-Verlag Berlin (1931) S. 180
- 77) MACH F. u. HERRMANN R., Landwirtsch.Versuchsstat. 119, 3 (1934)
- 78) MÜNZEL K., BÜCHI J. u. SCHULTZ O.-E., Galenisches Praktikum, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart (1959) S. 485
- 79) HAGERS Handbuch, Bd.I, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1967) S. 457
- 80) BLYTH, GULESICH u. TUTHILL, J.Amer.pharm.Ass.Sci.Ad. 38, 59 (1949)
- 81) FLÜCK H. u. AELLIG R., Bull.Galenica 16, 61 (1953)
- 82) ROL F., McCredie R.J. u. WHISTLER R.L. in Whistler R.L. u. Bemiller J.N. Industrial gums, Academic Press, New York and London, S.361 u.S.433
- 83) MÜHLSCHLEGEL H., in Diermaier W., Analytik der Lebensmittel, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1967) S. 1058
- 84) STEINEGGER E. u. HÄNSEL R., Lehrbuch der Pharmakognosie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1972) S. 106
- 85) STEINEGGER E. u. HÄNSEL R., Lehrbuch der Pharmakognosie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1972) S. 102
- 86) STEINEGGER E. u. HÄNSEL R., Lehrbuch der Pharmakognosie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1968) S. 102
- 87) McCREDIE R.J. u. WHISTLER R.J., in Whistler R.L. u. Bemiller J.N., Industrial gums, Academic Press, New York and London (1973) S. 348
- 88) McCREDIE R.J. u. WHISTLER R.J., in Whistler R.L. u. Bemiller J.N., Industrial gums, Academic Press, New York and London (1973) S. 340
- 89) ALIEV R.K., NAMAZOVA A.A. u. RAKHIMOVA A.Kh., Chem.Abstr. 56, 6090 (1962)
- 90) STEINEGGER E. u. HÄNSEL R., Lehrbuch der Pharmakognosie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1972) S. 101
- 91) LUCKNER M., Prüfung von Drogen, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena (1966) S. 253
- 92) PEDERSEN K.O., Arch.Biochem.Biophys., Suppl. 1, 157 (1962)
- 93) HJERTEN S. u. MOSBACH R., Anal.Biochem. 3, 109 (1962)
- 94) MOORE J.C., J.Polym.Sci. A 2, 835 (1964)
- 95) DETERMANN H., Angew.Chem. 76, 635 (1964)
- 96) DETERMANN H., Experientia 18, 430 (1962)
- 97) PORATH J. u. FLODIN P., Nature 183, 1657 (1959)
- 98) RADOLA J., J.Chromatog. 38, 61 (1968)
- 99) MORRIS C.J.O.R., J.Chromatog. 16, 167 (1964)
- 100) JOHANSSON B.G. u. RYMO L., Acta Chem.Scand. 16, 2067 (1962)
- 101) JAWOREK D., Dünnschicht-Chromatographie und -Elektrophorese an Molekularsieben in Symposium VI Chromatographie Elektrophorese Presses Academiques Europeennes S.C. Bruxelles (1971) S.118

- 102) ROBERTS G.P., J.Chromatog. 22, 90 (1966)
- 103) JARETZKY R. u. ULBRICH H., Arch.Pharmaz. 272, 796 (1934)
- 104) PAVLENKO A.F. u. OVODOV YU.S., J.Chromatog. 52, 165 (1970)
- 105) RIENTIS K.G., Biochem. 53, 79 (1953)
- 106) HAIS I.M. u. MACEK K., Papierchromatographie Bd.I, Grundlagen und Technik, VEB Gustav Fischer-Verlag Jena (1963) S. 915
- 107) CLAUSSEN J. u. ROSENKAST P., Acta Pathol.Microbiol.Scand. 56, 188 (1962)
- 108) DUDMAN W.F. u. BISHOP C.T., Can.J.Chem. 46, 3079 (1968)
- 109) DETERMANN H., Gelchromatographie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1967) S. 58
- 110) WHITAKER J.R., Anal.Chem. 35, 1950 (1963)
- 111) ANDREWS P., Biochem.J. 96, 595 (1965)
- 112) SIEGEL L.M. u. MONTY K.J., Biochem.Biophys.Acta 112, 346 (1966)
- 113) GRANATH K. u. FLODIN P., Makromol.Chem. 48, 160 (1961)
- 114) GRANATH K. in Morris L.J. u. James A.T. (Editors) New Biochemical Separations von Norstrand, London (1964) S. 112
- 115) HUMMEL B.C.V. u. SMITH D.C., J.Chromatog. 8, 491 (1962)
- 116) LAURENT T. u. GRANATH K., Biochim.Acta 136, 191 (1967)
- 117) LAURENT T. u. KILLANDER J., J.Chromatog. 14, 317 (1964)
- 118) KÜHBAUCH W., Z.Acker- und Pflanzenbau 139, 85 (1974)
- 119) MATHE J., RACZ G. u. CSEDÖ K., Planta med. 29, 295 (1976)
- 120) MATHE J. u. RACZ G., Farmacia Vol.XXI, Nr.8 (1973)
- 121) CIFONELLI J.A., Carbohyd.Res. 2, 150 (1966)
- 122) GRANATH K.A. u. BERIT E.K., J.Chromatog. 28, 69 (1967)
- 123) FLODIN P. u. ASPBERG K., Biological Structure and Function Vol. 1, (1961) S. 345
- 124) LOEWUS F., Anal.Chem. 24, 219 (1952)
- 125) MALLOV S., McKIBBIN J. u. ROBB J.S., J.Biol.Chemistry 201, 825 (1953)
- 126) MÜNZEL K., BÜCHI J. u. SCHULTZ O.-E., Galenisches Praktikum, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart (1959) S. 291
- 127) CLOTTEN R. u. CLOTTEN A., Hochspannungselektrophorese, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1962) S. 463
- 128) PRIDHAM J.B., Biochem.J. 57, XXVIII (1954)
- 129) GAREGG J. u. LINDBERG B., Acta Chem.Scand. 15, 1913 (1961)
- 130) CONSDEN R. u. STANIER M.W., Nature 169, 737 (1952)
- 131) BERNIER B., Biochem.J. 70, 590 (1958)
- 132) JAENICKE L., Naturw. 39, 86 (1956)
- 133) PADMOYO M. u. MISEREZ A., Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg. 58, 31 (1967)
- 134) ORNSTEIN L. u. DAVIS B.J., "Disc-Electrophoresis", Preprinted by Destillation Products Industries, New York (1962)
- 135) MAURER H.R., Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter u.Co., Berlin (1968)
- 136) WEBER K. u. OSBORN M., J.Biol.Chem., Vol. 244, 16, 4406 (1969)
- 137) WAGEMANN R., Diss. in Vorbereitung, München
- 138) HILZ H. u. UTERMANN D., Biochem.Zschr. 332, 376 (1960)
- 139) RIBEIRO L.P., MITIDIERI E. u. AFFONSO O.R., Papaer Electrophoresis, Elsevier Publ.Comp., Amsterdam-London-New York-Princeton(1962) S. 298
- 140) FULLER K.W. u. NORTHCOTE D.H., Biochem.J., 64, 657 (1956)
- 141) FOSTER A.B., NEWTON-HEARN u. STACEY M., J.Chem.Soc. 474, 30 (1956)

- 142) BUTLER K. u. STACEY M., J.Chem.Soc. 1537 (1953)
- 143) JONES J.K.N., Biochem.Biophys.Acta 10, 607 (1953)
- 144) KALAC J., Cesk.Farm. 19(4), 143 (1970), Chem.Abstr. 73, 80438 (1970)
- 145) FLODIN P., Dissertation Uppsala 1962
- 146) SCHLUBACH H.H. u. GREHN M., Liebigs Ann.Chem. 668, 180 (1963)
- 147) STARK J.R., Carbohyd.Res. 47, 176 (1976)
- 148) NEUKOM H., DEUEL H., HENRI J.W. u. KÜNDIG W., Helv.Chim. Acta 43, 64 (1960)
- 149) SIDDIQUI J.R. u. WOOD P.J., Carbohyd.Res. 16, 452 (1971)
- 150) SCHMOLK W. u. MERGENTHALER E., Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 155, 193 (1974)
- 151) DÖRFNER K., Ionenaustauscher, Walter de Gruyter u. Co., Berlin, 3.Aufl. (1970) S. 220
- 152) MOLISCH H., Monatsch.Chem. 7, 108 (1886)
- 153) DISCHE Z.u.BORENFREUD E., J.Biol.Chem. 192, 583 (1951)
- 154) DISCHE Z., J.Biol.Chem. 181, 379 (1949)
- 155) DISCHE Z. in WHISTLER R.L., WOLFROM M.L.: Methods in Carbohydrate chemistry, Vol.I, Academic Press New York and London (1962) S. 479
- 156) GLASL H., J.Chromatog. 114, 215 (1975)
- 157) NOLLER C.R., Lehrbuch der Organischen Chemie, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960) S. 727
- 158) SCHWEIZER H.R., Organische Farbstoffe und ihre Zwischenprodukte, Springer-Verlag Göttingen-Heidelberg (1964) S.304
- 159) MÜNZEL K., BÜCHI J. u. SCHULTZ O.-E., Galenisches Praktikum, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. (1959) S. 494
- 160) THIELE H. u. CORDES J., Kolloid-Z.u.Z.Polymere 216-217, 361 (1967)
- 161) LIBBERT E., Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart (1973) S. 207
- 162) LARCHER W., Ökologie der Pflanzen, Eugen Ulmer-Verlag, Stuttgart (1973) S. 141
- 163) BAUMEISTER W. in Ruhland W., Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd.IV, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958) S.5
- 164) PURDIE T. u. IRVINE J.C., J.Chem.Soc. 83, 1021 (1903)
- 165) HAWORTH W.N., J.Chem.Soc. 107, 13 (1915)
- 166) DENHAM W.S. u. WOODHOUSE H., J.Chem.Soc. 103, 1735 (1913)
- 167) KUHN R., TRISCHMANN H. u. LÖW I., Angew.Chem. 67, 32 (1955)
- 168) HAKOMORI S., J.Biochem. 55, 205 (1964)
- 169) BJÖRNDAL H., LINDBERG B. u. SVENSSON S., Acta Chem.Scand. 21, 1801 (1967)
- 170) HAAB V. u. ANASTASSIADIS P., Can.J.Biochem. 39, 671 (1961)
- 171) ANASTASSIADIS P. u. COMMON R., Can.J.Biochem. 36, 413 (1958)
- 172) MÜLLER K. u. TÄUFEL K., Naturwissensch. 40, 140 (1953)
- 173) KILIANI H., Chem.Ber. 63, 2866 (1930)
- 174) ALBERSHEIM P., NEVIUS D., ENGLISH P.D. u. KARR A., Carbohyd. Res. 5, 340 (1967)
- 175) HAIS I.M. u. MACEK K., Papierchromatographie Bd. I., Grundlagen und Technik, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena (1963) S. 332
- 176) CRAMER F., Papierchromatographie, Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstr., 5.Aufl. (1962) S. 68
- 177) READSVELD C.W. u. KLÖMP H., J.Chromatog. 57, 99 (1971)
- 178) WOLFROM M.L., PLATIN D.L. u. LEDERKREMER R.M.D., J.Chromatog. 17, 488 (1965)

- 179) MARAIS J.P., J.Chromatog. 27, 321 (1967)
- 180) KARTNIG Th. u. WEGSCHAIDER O., J.Chromatog. 61, 375 (1971)
- 181) RANDERATH K., Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstr. (1965) S. 242
- 182) WIELE H. u. HORAK E., J.Chromatog. 47, 527 (1970)
- 183) SPITSCHAN R., J.Chromatog. 61, 169 (1971)
- 184) PARTIDGE S.M., Nature 164, 443 (1949)
- 185) PESCHKE W., J.Chromatog. 20, 572 (1965)
- 186) SCHWEIGER A., J.Chromatog. 9, 374 (1962)
- 187) CHARGAFF E., LEVINE C. u. GREEN C., J.Biol.Chem. 175, 67 (1948)
- 188) STAHL E., Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1967) S. 852
- 189) VOELTER W. u. BAUER H., GIT 17, 846
- 190) KÖNIG W., VOELTER W., LÜCKE J. u. BAUER H., Z.Naturforsch. 29b, 1 (1974)
- 191) McINNES A.G., BALL D.H., COPPER F.P. u. BISHOP C.T., J.Chromatog. 1, 556 (1958)
- 192) VANDEN HEVVEL W.J.A. u. HORNING E.C., Biochem.Biophys.Res. Commun. 4, 399 (1961)
- 193) KÖNIG W.A., BAUER H., VOELTER W. u. BAYER E., Chem.Ber. 106, 1905 (1973)
- 194) BENTLEY R., SWEETLEY C.C., MAKITA M. u. WELLS W., J.Amer. Chem.Soc. 85, 2497 (1963)
- 195) WULFF G., J.Chromatog. 18, 285 (1965)
- 196) SCHMOLK W. u. MERGENTHALER E., Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 152, 263 (1973)
- 197) SENNELDO L.T., J.Chromatog. 56, 121 (1971)
- 198) HADORN H., Mitt.Gebiet.Lebensm.Hyg. 68, 198 (1974)
- 199) ZÜRCHER K. u. HADORN H., Dtsch.Lebensmittel-Rdsch. 12, 425 (1974)
- 200) EISENBERG F.J., Carbohyd.Res. 19, 135 (1971)
- 201) MERGENTHALER E. u. SCHERZ H., Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 162, 25 (1976)
- 202) PETERSSON G., Carbohyd.Res. 33, 47 (1974)
- 203) ZÜRCHER K. u. HADORN H., Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg. 67, 379 (1976)
- 204) ABDEL-AKHER M., HAMILTON J.K. u. SMITH F., J.Amer.Chem.Soc. 73, 4691 (1951)
- 205) SLONEKER J.H., Meth.in Carbohyd.Chemistry VI, Academic Press, New York and London (1970) S. 20
- 206) GROB K. u. GROB G., Chromatographia 5, 1 (1972)
- 207) TESARIK K., J.Chromatographie 65, 295 (1972)
- 208) TESARIK K., GHYCZY S. u. PANSARE V.S., Chromatographia 4, 396 (1971)
- 209) FERRIER R.J. u. COLLINS P.M., Monosaccharide chemistry, Penguin Books Ltd. Harmondsworth, Middlesex, England (1972) S. 47
- 210) MEYER A., Bot.Ztg. 43, 417, 433, 449, 465, 481, 497 (1885)
- 211) RUTKOWSKI A. u. ALEKSIEJCZYK Z., Chem.Abstr. 66, 500 (1967)
- 212) LEFEVRE K.U. u. TOLLENS B., Ber.dtsch.chem.Ges. 40, 4513 (1907)
- 213) WHISTLER R.L. u. FEATHER M.S. in Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol.I, Academic Press, New York and London (1962) S. 464

- 214) McCREADY R.M., SWENSON H.W. u. MACLAY W.D., Ind.Eng.Anal.Ed. 18, 290 (1964)
- 215) CASTAGNE A.L., Carbohyd.Res. 42, 382 (1975)
- 216) DISCHE Z., J.Biol.Chem. 167, 189 (1947)
- 217) MILITZLER W.E., Arch.Biochemistry 9, 85 (1946)
- 218) WAGNER W., Anal.Chim.Acta 29, 227 (1963)
- 219) HELBERT J.R. u. BROWN K.D., Analytic.Chem. 28, 1098 (1956)
- 220) DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K. u. REBERS P.A., Analyt. Chem. 28, 350 (1956)
- 221) DISCHE Z., Arch.Biochem. 16, 409 (1948)
- 222) CLOTTEN R., CLOTTEN A., Hochspannungselektrophorese, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1962) S. 107
- 223) Organikum, 12.Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1973) S. 600
- 224) COOKE A.A. u. PERCIVAL E., Carbohyd.Res. 43, 117 (1975)
- 225) RATHBONE E.B., STEPHEN A.M. u. PACHLER K.G.R., Carbohyd.Res. 20, 141 (1971)
- 226) RATHBONE E.B., STEPHEN A.M. u. PACHLER K.G.R., Carbohyd.Res. 21, 83 (1972)
- 227) CASU B., REGGIANI M., GALLO G.G. u. VIGEVANI A., Carbohyd. Res. 12, 157 (1970)
- 228) KEILICH H., SIEFERT E. u. FRIEBOLIN H., Org.Mag.Res. 3, 31 (1971)
- 229) KEILICH G., FRANK N. u. HUSEMANN E., Makrom.Chem. 143, 275 (1971)
- 230) FRANK N., Dissertation Freiburg i.Br. (1974)
- 231) KEILICH E. u. BITTIGER H., Biopolymers 11, 1997 (1972)
- 232) KEILICH E., SALIMINEN P. u. HUSEMANN E., Makrom.Chem. 141, 117 (1971)
- 233) BECKEY H.D., Angew.Chem. 81, 662 (1969)
- 234) BECKEY H.D., "Field Ionization Mass Spectrometry", Pergamon Press (1971)
- 235) BRAUN W.L., HODGSON F.N. u. DESJARDINS M., J.Chem.Phys. 38, 2787 (1963)
- 236) BECKEY H.D., Angew.Chem. 81, 662 (1969)
- 237) BECKEY H.D., Int.J.Mass.Spectrom.Ion Phys. 2, 500 (1969)
- 238) KRONE H. u. BECKEY H.D., Org.Mass Spectrom. 2, 427 (1969)
- 239) RINEHART K.L., COOK Jr.J.C., MAURER K.H. u. RAPP U., J.Antibiot. 27, 1 (1974)
- 240) SCHULTEN H.-R. u. GAMES D.E., Biomed.Mass Spectrom. 1, 120 (1974)
- 241) ADLERCREUTZ H., SOLTSMANN B. u. TIKKANEN M.J., J.Steroid Biochem. 5, 163 (1964)
- 242) SCHULTEN H.-R. u. BECKEY H.D., Org.Mass Spectrom 7, 861 (1973)
- 243) POSTHUMUS M.A., NIBBERING N.M.M., BOERBOOM A.J.H. u. SCHULTEN H.-R., Biomed.Mass Spectrom. 1, 352 (1974)
- 244) MEUZELAAR H.L.C. u. KISTEMAKER P.G., Anal.Chem. 45, 587 (1973); MEUZELAAR H.L.C., POSTHUMUS M.A., KISTEMAKER P.G. u. KISTEMAKER J., ibid. 45, 1546 (1973)
- 245) SCHULTEN H.-R., Proc. of the Third Int.Symposium on Analytical Pyrolysis, Elsevier Comp., Amsterdam, in press (1977)
- 246) LATO M., BRUNELLI B. und CIUFFINI G., J.Chromatog. 34, 26 (1968)
- 247) PASTUSKA G., Z.Analyt.Chem. 179, 427 (1961)
- 248) ADACHI S., J.Chromatog. 17, 295 (1965)

- 249) STAHL E. u. KALTENBACH U., J.Chromatog. 5, 351 (1961)
- 250) WALDI D., J.Chromatog. 18, 417 (1969)
- 251) ITASAKA O., J.Biochem. 60, 52 (1966)
- 252) BATH-SMITH A.C. u. WESTALL R.G., Biochem. et Biophys.Acta 4, 427 (1950)
- 253) TREVELYAN W.E., PROCTER D.P. u. HARRISON J.S., Nature (London) 166, 444 (1950)
- 254) MORSA E.E. u. DREYWOOD R., Analyt.Chem. 19, 1012 (1947)
- 255) EDWARD J.T. u. WALDRON D.M., J.Chem.Soc. 3631 (1952)
- 256) STAHL E., Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1967) S. 840
- 257) PARTRIDGE S.M., Biochem.J. 42, 238 (1948)
- 258) HANES C.S. u. ISHERWOOD F.A., Nature 164, 1107 (1949)

LEBENS LAUF

Heide Hermann

Geburtstag:	31.5.1940
Geburtsort:	Dessau/Anhalt
Eltern:	Friedrich Hermann, Dipl.-Ingenieur Gisela Hermann, geb. Schäfer
1946 - 1953	Volksschule Aken/Elbe
1953 - 1956	Realschule Memmingen
1956 - 1960	Oberrealschule Memmingen
Juni 1960	Abitur
1960 - 1962	Praktikantin in der Elefanten- Apotheke Memmingen
September 1962	Pharmazeutisches Vorexamen
1962 - 1964	Vorexaminierte in Apotheken in Herborn/Dillkreis und Berlin
1964 - 1967	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Mai 1967	Pharmazeutisches Staatsexamen
September 1968	Approbation als Apotheker
1967 - 1972	Leitende Angestellte in Apotheken in Memmingen, Tegernsee und München
1.11.1972 - 31.8.1973	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Arznei- mittellehre der Universität München
seit 1.9.1973	Verwalterin der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Pharmazeutische Arznei- mittellehre der Universität München
November 1972	Beginn der vorliegenden Arbeit Leitung: Professor Dr. H. Wagner

